

**JP09070291A**

**MicroPatent Report**

**AMPLIFICATION OF GENE USING ARTIFICIAL  
TRANSPOSON**

<p><b>[71] Applicant:</b> AJINOMOTO CO INC</p> <p><b>[72] Inventors:</b> MORIYA MIKA; MATSUI YUTAKA; YOKOZEKI KENZO; HIRANO KIYOKO ...</p> <p><b>[21] Application No.:</b> JP08157090</p> <p><b>[22] Filed:</b> 19960618</p> <p><b>[43] Published:</b> 19970318</p> <p><b>[30] Priority:</b> JP 07166541 19950630</p> <p><b><u>Go to Fulltext</u></b></p>	<p><b>[No drawing]</b></p>
<p><b>[57] Abstract:</b></p> <p><b>PROBLEM TO BE SOLVED:</b> To amplify a desired gene on a chromosome by creating an artificial transposon having a medicine- resistant gene and a desired gene between both inverted repeats and capable of transferring in a specific bacterial cell and introducing the transposon into a cell and transferring the transposon onto the chromosome. <b>SOLUTION:</b> An artificial transposon having a structure inserting a desired gene comprising a gene which participates in biosynthesis of amino acid, e. g. drug-resistant gene such as a chloramphenicol-resistant gene or a tetracycline-resistant gene and an aspartokinase gene and/or a dihydropicolinic acid synthetase gene into inverted repeats derived from an insertion sequence of a coryneform bacterium and capable of transferring in the coryneform bacterium cell is created and the artificial transposon is introduced into the coryneform bacterium cell and transferred onto chromosome of the chromosome bacterium and a desired gene is introduced onto the chromosome and amplified to provide a coryneform bacterium used for industrial production of amino acid and nucleic acid.</p> <p><b>[51] Int'l Class:</b> C12N01509 C07H02104 C12N00121 C12P01308 C12N00912 C12Q00168 C12N01509 C12R00113 C12N00121 C12R00113 C12N00121 C12R00119 C12P01308 C12R00113 C12N00912 C12R00113 C12N00912 C12R00119</p>	



(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平9-70291

(43)公開日 平成9年(1997)3月18日

(51)Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09	Z N A	9162-4B	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 0 7 H 21/04			C 0 7 H 21/04	B
C 1 2 N 1/21			C 1 2 N 1/21	
C 1 2 P 13/08			C 1 2 P 13/08	
// C 1 2 N 9/12			C 1 2 N 9/12	

審査請求 未請求 請求項の数10 O L (全 61 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平8-157090	(71)出願人	000000066 味の素株式会社 東京都中央区京橋1丁目15番1号
(22)出願日	平成8年(1996)6月18日	(72)発明者	守屋 美加 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央研究所内
(31)優先権主張番号	特願平7-166541	(72)発明者	松井 裕 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央研究所内
(32)優先日	平7(1995)6月30日	(72)発明者	横関 健三 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央研究所内
(33)優先権主張国	日本 (J P)		

最終頁に続く

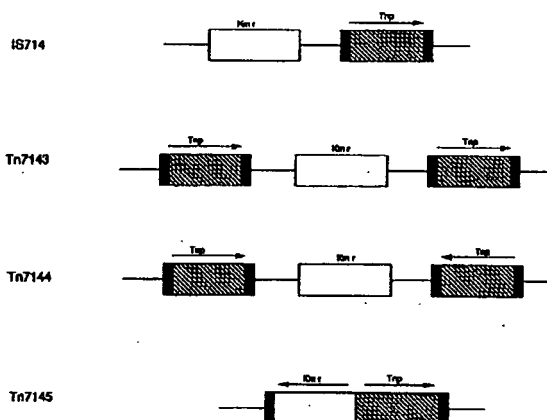
(54)【発明の名称】 人工トランスポゾンを用いた遺伝子増幅方法

(57)【要約】

【課題】 コリネホルム細菌の育種方法を新たに提供する。

【解決手段】 コリネホルム細菌由来のインサージョンシーケンス内に薬剤耐性遺伝子及び所望の遺伝子を挿入した人工トランスポゾンを造成し、該人工トランスポゾンをコリネホルム細菌に導入することを含んでなる、該コリネホルム細菌の染色体上に当該所望の遺伝子を増幅する方法。

【効果】 本発明の方法によれば、アミノ酸や核酸の工業生産に用いられるコリネホルム細菌において所望の遺伝子を染色体上で増幅させることができ、該細菌を育種改良することができる。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 インバーテッドリピートに、薬剤耐性遺伝子及び所望の遺伝子が挟まれた構造を有し、コリネホルム細菌細胞内で転移可能な人工トランスポゾンを作成し、該人工トランスポゾンをコリネホルム細菌細胞内に導入して、該トランスポゾンを該コリネホルム細菌の染色体上に転移させて、該染色体上に当該所望の遺伝子を導入し増幅する方法。

【請求項2】 人工トランスポゾンが、インバーテッドリピートにさらにトランスポゼース遺伝子が挟まれた構造を有するものである請求項1記載の方法。

【請求項3】 インバーテッドリピート及びトランスポゼース遺伝子が、コリネホルム細菌のインサージョンシーケンス由来のものである請求項1ないし2記載の方法。

【請求項4】 インサージョンシーケンスが配列表配列番号1、5及び9記載のいずれかで表される塩基配列を有する請求項3記載の方法。

【請求項5】 薬剤耐性遺伝子がクロラムフェニコール耐性遺伝子またはテトラサイクリン耐性遺伝子である請求項1ないし4記載の方法。

【請求項6】 所望の遺伝子がアミノ酸生成に関与する遺伝子である請求項1ないし5記載の方法。

【請求項7】 所望の遺伝子がアスパルトキナーゼ遺伝子および/またはジヒドロピコリン酸合成酵素遺伝子である請求項6記載の方法。

【請求項8】 請求項1ないし7のいずれかに記載の方法により染色体上に所望の遺伝子が導入されたコリネホルム細菌。

【請求項9】 請求項6記載の方法により染色体上にアミノ酸生成に関与する遺伝子が導入されたコリネホルム細菌を培地に培養し、培地中にアミノ酸を生成蓄積させ、該アミノ酸を回収することを特徴とするアミノ酸の製造法。

【請求項10】 アミノ酸生成に関与する遺伝子がアスパルトキナーゼ遺伝子および/またはジヒドロピコリン酸合成酵素遺伝子であり、アミノ酸がリジンである、請求項9記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、コリネホルム細菌で転移可能な人工トランスポゾンを用いてコリネホルム細菌の染色体上に所望の遺伝子を増幅する方法及び該方法により得られたコリネホルム細菌に関する。所望の遺伝子がアミノ酸や核酸等の生成に関与する遺伝子であれば、得られるコリネホルム細菌を用いてアミノ酸や核酸等を生産することができる。染色体上で所望の遺伝子を増幅する方法は、アミノ酸や核酸の工業生産に用いられるコリネホルム細菌を育種改良する上で重要である。

【0002】

【従来の技術】コリネホルム細菌を育種改良し、アミノ酸や核酸を効率良く生産するための研究はこれまで精力的に行われてきた。育種を行うための手段としては、遺伝子工学によるものも数多く報告されている。コリネホルム細菌の育種を目的にした遺伝子操作技術は、プロトプラストによるトランスフォーメーション法の確立 (Katsumata, R., Ozaki, A., Oka, T. and Furuya, A. :J. Bacteriol., 159, 306-311(1984)、Santamaria, R. I., Gil, J. A. and Martin, J. F. :J. Bacteriol., 161, 463-467 (1985))、各種ベクターの開発 (Miwa, K., Matsui, H., Terabe, M., Nakamori, S., Sano, K. and Momose, H. :Agric. Biol. Chem., 48, 2901-2903 (1984)、Katsumata, R., Ozaki, A., Oka, T. and Furuya, A. :J. Bacteriol., 159, 306-311(1984)、Santamaria, R. I., Gil, J. A., Mesa, J. M. and Martin, J. F. :J. Gen. Microbiol., 130, 2237-2246 (1984)、Yeh, P., Oreglia, J., Prevotos, F. and Scicard, A. M. :Gene, 47, 301-306 (1986)、Patek, M., Nesvera, J. and Hochmannova, J. :Appl. Microbiol. Biotechnol., 31, 65-69 (1989))、遺伝子発現制御法の開発 (Tsuchiya, M. and Morinaga, Y. :Bio/Technology, 6, 428-430 (1988)) 及びコスミドの開発 (Miwa, K., Matsui, K., Terabe, M., Ito, K., Ishida, M., Takagi, H., Nakamori, S. and Sano, K. :Gene, 39, 281-286 (1985)) など、プラスミドやファージを用いた系で発展してきた。またコリネホルム細菌由来の遺伝子クローニング (Matsui, K., Sano, K. and Ohtsubo, E. :Nucleic Acids Res., 14, 10113-10114 (1986)、Follettie, M. T. and Shinskey, A. J. :J. Bacteriol., 167, 695-702 (1986)、Mateos, L. M., Del, R. G., Aguilar, A. and Martin, J. F. :Nucleic Acids Res., 15, 10598 (1987)、Mateos, L. M., Del, R. G., Aguilar, A. and Martin, J. F. :Nucleic Acids Res., 15, 3922 (1987)、Melumbres, M., Mateos, L. M., Guerrero, C. and Martin, J. F. :Nucleic Acids Res., 16, 9859 (1988)、Matsui, K., Miwa, K. and Sano, K. :Agric. Biol. Chem., 52, 525-531 (1988)、Peoples, O. P., Liebl, W., Bodis, M., Maeng, P. J., Follettie, M. T., Archer, J. A. and Shinskey, A. J. :Mol. Microbiol., 2, 63-72 (1988)、Eikmanns, B. J., Follettie, M. T., Griot, M. U., Martin, U. and Shinskey, A. J. :Mol. Gen. Genet., 218, 330-339 (1989)、O'Regan, M., Thierbach, G., Bachmann, B., Vgilleval, D., Lepage, P., Viret, J. F. and Lemoine, Y. :Gene, 77, 237-251 (1989)) 及び各種アミノ酸の収率増加 (Sano, K., Miwa, K. and Nakamori, S. :Agric. Biol. Chem., 51, 597-599 (1987)) についても報告されている。

【0003】最近、コリネホルム細菌由来の転移因子が相次いで報告されている (W092/02627、W093/18151、EP 0445385、特開平6-46867号、Vertes, A. A., Inui, M., Kobayashi, M., Kurusu, Y. and Yukawa, H. :Mol. Microbiol., 11, 739-746 (1994)、Bonamy, C., Labarre,

J., Reyer, O. and Leblon, G. :Mol. Microbiol., 14, 571-581 (1994)、Vertes, A. A., Asai, Y., Inui, M., Kobayashi, M., Kurusu, Y. and Yukawa, H. :Mol. Gen. Genet., 245, 397-405 (1994)、Jagar, W., Schafer, A., Kalinowski, J. and Puhler, A. :FEMS Microbiology Letters, 126, 1-6 (1995)、特開平7-107976号)。

【0004】転移因子とは、染色体上で転移し得るDNA断片で、原核生物から真核生物までの広い範囲の生物に存在することが知られている。真核生物ではトウモロコシ、ショウジョウバエや酵母等で、原核生物ではエシェリヒア・コリ等で詳しい知見が得られている (Mobile DNA. American Society for Microbiology, Washington D.C. (1989))。細菌の転移因子はインサージョンシーケンスとトランスポゾンの二種類に分類される。インサージョンシーケンスは大きさが760~2000bp程度のDNA断片で、両端に8~20bp程度のインバーテッドリピートを有し、内部には転移に必要な酵素であるトランスポゼースをコードしている。一方、トランスポゾンはインバーテッドリピートやトランスポゼースに加えて、転移機能には直接関与しない薬剤耐性遺伝子等の遺伝子を併せ持つ転移因子であり、2つのインサージョンシーケンスの間に薬剤耐性遺伝子が挟まれた形のものとしてインサージョンシーケンス内に薬剤耐性遺伝子が挿入された形のものがある。インサージョンシーケンス及びトランスポゾンの両方に共通する特徴として、これらが導入された標的遺伝子部位で、約10bpの塩基配列重複が見られることも知られている (Mobile Genetic Elements. Academic Press, New York, p.159-221(1983))。

【0005】現在知られている転移因子の中には、エシェリヒア・コリのトランスポゾンTn10、Tn5やMuファージなど、染色体遺伝子工学に非常に利用価値の高いものがある。これらの利用例として、トランスポゾンを染色体上の遺伝子の中に転移させることにより、1) 遺伝子破壊を生じてその染色体遺伝子の発現を抑える、2) トランスポゾン上にプロモーター配列を挿入しておくことによりその導入部位にある染色体遺伝子を発現させる、3) 異種あるいは同種の所望の遺伝子をトランスポゾン上に搭載しておき、転移を行わせることによって染色体に新たな遺伝子を導入する、等が考えられる (Mobile DNA. American Society for Microbiology, Washington D.C., p.879-925 (1989))。

【0006】コリネホルム細菌においては最近、インサージョンシーケンスなる転移因子が見いだされたが、薬剤耐性遺伝子等を持つトランスポゾン型のものは見いだされていない。ただし、人工的にカナマイシン耐性遺伝子を挿入したトランスポゾンを作製し (W093/18151、特開平7-107976号、Vertes, A. A., Asai, Y., Inui, M., Kobayashi, M., Kurusu, Y. and Yukawa, H. :Mol. Gen. Genet., 245, 397-405 (1994))、染色体上に転移を

行わせることは可能となってきた。ここで造成された人工トランスポゾンは、2つのインサージョンシーケンスの間に薬剤耐性遺伝子が挟まれた形のもの (W093/18151) とインサージョンシーケンス内に薬剤耐性遺伝子が挿入された形のもの (特開平7-107976号、Vertes, A. A., Asai, Y., Inui, M., Kobayashi, M., Kurusu, Y. and Yukawa, H. :Mol. Gen. Genet., 245, 397-405 (1994)) とがあるが、このような人工トランスポゾンは、多コピーでの転移が認められていないか、もしくはコピー数の増加が満足のいくものではなく、アミノ酸や核酸工業に利用価値のある遺伝子増幅のための技術には未だ至っていない。

#### 【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、コリネホルム細菌由来のインサージョンシーケンスをもとに、薬剤耐性遺伝子と所望の有用な遺伝子を搭載した人工トランスポゾンを造成し、該人工トランスポゾンを用いてアミノ酸や核酸の工業生産に用いられるコリネホルム細菌の染色体上に所望の遺伝子を増幅する方法を提供することを目的とする。また、本発明は、所望の有用な遺伝子が染色体上に増幅されたコリネホルム細菌を提供することも目的とする。さらに、本発明は、所望の有用な遺伝子が染色体上に増幅されたコリネホルム細菌を用いて、アミノ酸、核酸等の物質を製造する方法を提供することを目的とする。

#### 【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を解決するために、エシェリヒア・コリ等で既知のトランスポゾンにおいて、インサージョンシーケンスの特徴を示す両端のインバーテッドリピート構造の間に転移機能とは無関係な薬剤耐性遺伝子を持つ構造を取って転移することに着目し、コリネホルム細菌の染色体DNA中に存在するインサージョンシーケンスの両端のインバーテッドリピートの間に、転移機能には関与しない薬剤耐性遺伝子及び所望の遺伝子を挿入した構造を有するトランスポゾン様配列を人工的に種々構築し、これらのトランスポゾン様配列 (人工トランスポゾン) が効率良く転移を行うことを見だし、さらに薬剤耐性遺伝子とその選択濃度を適宜設定することにより、多コピーの人工トランスポゾンが染色体に転移した遺伝子増幅体を効率よく取得することができることを見だし、本発明を完成するに至った。

【0009】すなわち、本発明は以下のとおりである。

(発明1) インバーテッドリピートに、薬剤耐性遺伝子及び所望の遺伝子が挟まれた構造を有し、コリネホルム細菌細胞内で転移可能な人工トランスポゾンを造成し、該人工トランスポゾンをコリネホルム細菌細胞内に導入して、該トランスポゾンを該コリネホルム細菌の染色体上に転移させて、該染色体上に当該所望の遺伝子を導入し増幅する方法。

(発明2) 人工トランスポゾンが、インバーテッドリピートにさらにトランスポゼース遺伝子が挟まれた構造を有するものである発明1記載の方法。

(発明3) インバーテッドリピート及びトランスポゼース遺伝子が、コリネホルム細菌のインサージョンシーケンス由来のものである発明1ないし2記載の方法。

(発明4) インサージョンシーケンスが配列表配列番号1、5及び9記載のいずれかで表される塩基配列を有する発明3記載の方法。

(発明5) 薬剤耐性遺伝子がクロラムフェニコール耐性遺伝子またはテトラサイクリン耐性遺伝子である発明1ないし4記載の方法。

(発明6) 所望の遺伝子がアミノ酸生合成に関与する遺伝子である発明1ないし5記載の方法。

(発明7) 所望の遺伝子がアスパルトキナーゼ遺伝子および/またはジヒドロピコリン酸合成酵素遺伝子である発明6記載の方法。

(発明8) 発明1ないし7のいずれかに記載の方法により染色体上に所望の遺伝子が導入されたコリネホルム細菌。

(発明9) 発明6記載の方法により染色体上にアミノ酸生合成に関与する遺伝子が導入されたコリネホルム細菌を培地に培養し、培地中にアミノ酸を生成蓄積させ、該アミノ酸を回収することを特徴とするアミノ酸の製造法。

(発明10) アミノ酸生合成に関与する遺伝子がアスパルトキナーゼ遺伝子および/またはジヒドロピコリン酸合成酵素遺伝子であり、アミノ酸がリジンである、発明9記載の方法。

#### 【0010】

【発明の実施の形態】本発明にいうインバーテッドリピートとは、コリネホルム細菌から単離される転移因子の両端に存在するものが好ましい。コリネホルム細菌由来の転移因子としては、例えば配列表配列番号1、5及び9に記載されるインサージョンシーケンスが知られているが(WO93/18151)、配列番号1記載のインサージョンシーケンスIS714は5'側に配列番号3記載の配列を、逆鎖5'側に配列番号4記載の配列を有し、インバーテッドリピートを形成している。配列番号5記載のインサージョンシーケンスIS719は5'側に配列番号7記載の配列を、逆鎖5'側に配列番号8記載の配列を有し、インバーテッドリピートを形成している。配列番号3、4、7及び8のうちから選ばれる1種類の配列を5'側と逆鎖5'側に配置してインバーテッドリピートを形成させることもできるし、配列番号3、4、7及び8のうちから選ばれる2種類の配列をそれぞれ5'側と逆鎖5'側に配置してインバーテッドリピートを形成させることもできる。配列番号9記載のインサージョンシーケンスIS903は5'側に配列番号11記載の配列を、逆鎖5'側に配列番号12記

載の配列を有し、インバーテッドリピートを形成している。配列番号10及び11のうちから選ばれる1種類の配列を5'側と逆鎖5'側に配置してインバーテッドリピートを形成させることもできるし、配列番号10及び11の2種類の配列をそれぞれ5'側と逆鎖5'側に配置してインバーテッドリピートを形成させることもできる。本発明のインバーテッドリピートは、配列番号1、5及び9に記載される配列を有するものだけに限定されず、他の配列でも転移因子の中で機能するものも存在する。

【0011】本発明にいう薬剤耐性遺伝子は、カナマイシン耐性遺伝子、クロラムフェニコール耐性遺伝子及びテトラサイクリン耐性遺伝子の他、アンピシリンやメトロキサセト耐性遺伝子等の種々の薬剤に耐性な遺伝子が挙げられる。特に、薬剤耐性度と薬剤耐性遺伝子のコピー数が相関関係にある薬剤耐性遺伝子が好ましい。

【0012】増幅されるべき所望の遺伝子としては、各種アミノ酸及び核酸の生合成に関与する遺伝子が挙げられる。例えば、グルタミン酸生合成のためのグルタミン酸脱水素酵素遺伝子、グルタミン生合成のためのグルタミン合成酵素遺伝子、リジン生合成のためのアスパルトキナーゼ遺伝子(以下、アスパルトキナーゼを「AK」と、アスパルトキナーゼ遺伝子を「lysC」と呼ぶことがある)、ジヒドロピコリン酸合成酵素遺伝子(以下、ジヒドロピコリン酸合成酵素を「DDPS」と、ジヒドロピコリン酸合成酵素遺伝子を「dapA」と呼ぶことがある)、ジヒドロピコリン酸レダクターゼ遺伝子(以下、ジヒドロピコリン酸レダクターゼを「DDPR」と、ジヒドロピコリン酸レダクターゼ遺伝子を「dapB」と呼ぶことがある)、ジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼ遺伝子(以下、ジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼを「DDC」と、ジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼ遺伝子を「lysA」と呼ぶことがある)、ジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子(以下、ジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼを「DDH」と、ジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子を「ddh」という)、スレオニン生合成のためのホモセリン脱水素酵素遺伝子、イソロイシンやバリン生合成のためのアセトヒドロキシ酸合成酵素遺伝子、ロイシン生合成のための2-イソプロピルリンゴ酸合成酵素遺伝子、プロリンやアルギニン生合成のためのグルタミン酸キナーゼ遺伝子、ヒスチジン生合成のためのフォスホリボシル-ATPピロフォスホリラーゼ遺伝子、トリプトファン、チロシン及びフェニルアラニン等の芳香族アミノ酸生合成のためのデオキシアラビノヘプツロン酸リン酸(DAHP)合成酵素遺伝子や核酸、例えばイノシン酸やグアニル酸生合成のためのホスホリボシルピロフォスフェート(PRPP)アミドトランスフェラーゼ遺伝子、イノシグアノシンキナーゼ遺伝子、イノシン酸(IMP)脱水素酵素遺伝子やグアニル酸

(GMP) 合成酵素遺伝子等がある。その他、インターロイキン2やインターロイキン6等の生理活性蛋白質等をコードする遺伝子も挙げられる。

【0013】本発明にいうコリネホルム細菌とは、Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th Ed., p. 599 (1974)に記載されているように、好気性のグラム陽性桿菌であり、従来よりコリネバクテリウム属に分類されている細菌、従来ブレバクテリウム属に分類されていたが現在コリネバクテリウム属細菌として統合された細菌(Int. J. Syst. Bacteriol., 41, 255 (1981))、及びコリネバクテリウム属と非常に近縁なブレバクテリウム属細菌やミクロバクテリウム属細菌を含むものであり、一般にL-グルタミン酸生産菌として知られている下記のような微生物である。

コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム

コリネバクテリウム・アセトグルタミカム

コリネバクテリウム・カルナエ

コリネバクテリウム・グルタミカム

コリネバクテリウム・リリウム (コリネバクテリウム・グルタミカム)

コリネバクテリウム・メラセコーラ

ブレバクテリウム・ディバリカタム (コリネバクテリウム・グルタミカム)

ブレバクテリウム・フラバム (コリネバクテリウム・グルタミカム)

ブレバクテリウム・インマリオフィラム

ブレバクテリウム・ラクトファーメンタム (コリネバクテリウム・グルタミカム)

ブレバクテリウム・ロゼウム

ブレバクテリウム・サッカロリティカム

ブレバクテリウム・チオゲニタリス

ブレバクテリウム・アンモニアゲネス (コリネバクテリウム・アンモニアゲネス)

ミクロバクテリウム・アンモニアフィラム

コリネバクテリウム・サーモアミノゲネス

【0014】具体的に例示すると、下記のような野生株及びこれらから誘導される各種変異株が挙げられる。

コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム ATCC 13870

コリネバクテリウム・アセトグルタミカム ATCC 15806

コリネバクテリウム・カルナエ ATCC 15991

コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC 13020

コリネバクテリウム・リリウム (コリネバクテリウム・グルタミカム) ATCC 15990

コリネバクテリウム・メラセコーラ ATCC 17965

ブレバクテリウム・ディバリカタム (コリネバクテリウム・グルタミカム) ATCC 14020

ブレバクテリウム・フラバム (コリネバクテリウム・グルタミカム) ATCC 14067

ブレバクテリウム・インマリオフィラム ATCC 14068

ブレバクテリウム・ラクトフェルメンタム (コリネバクテリウム・グルタミカム) ATCC 13869

ブレバクテリウム・ロゼウム ATCC 13825

ブレバクテリウム・サッカロリティカム ATCC 14066

ブレバクテリウム・チオゲニタリス ATCC 19240

ブレバクテリウム・アンモニアゲネス (コリネバクテリウム・アンモニアゲネス) ATCC 6871

ミクロバクテリウム・アンモニアフィラム ATCC 15354

コリネバクテリウム・サーモアミノゲネス AJ 12340 (FERM BP-1539)

【0015】本発明の人工トランスポゾンとは、インパーテッドリピートに、薬剤耐性遺伝子及び所望の遺伝子が挟まれた構造を有するものであり、かつ、コリネホルム細菌細胞内で転移可能なものである。

【0016】本発明のトランスポゼースとは、たとえば配列表配列番号2及び6で示されるアミノ酸配列を有するものが考えられる。ただし、トランスポゼース活性を有する限り、1または2以上のアミノ酸残基が欠失、挿入、付加、置換又は転移されていてもかまわない。本発明のトランスポゼース遺伝子とは、例えば配列表配列番号1で示される塩基配列のうち130番目から1437番目の配列があり、配列表配列番号5で示される塩基配列のうち130番目から1437番目の配列がある。遺伝子産物がトランスポゼース活性を有する限り、1または2以上の塩基が欠失、挿入、付加、置換又は転移されていてもかまわない。トランスポゼース遺伝子は人工トランスポゾン内部にあってもかまわない。すなわち、インパーテッドリピートに挟まれて、かつ、薬剤耐性遺伝子及び所望の遺伝子の機能を損なわないように配置される。トランスポゼース遺伝子は人工トランスポゾン外部にあってもかまわない。人工トランスポゾンが搭載されるベクターに同時に搭載されても良いし、該ベクターとは別のもうひとつのベクターに搭載されていても良い。コリネホルム細菌の染色体上に存在していても良い。

【0017】本発明の人工トランスポゾンを構築するには、コリネホルム細菌由来の転移因子を出発材料にする構築操作が楽である。

【0018】本発明で使用するインサージョンシーケンスは、上記のコリネホルム細菌の染色体上に存在し、大きさが760~2000bp程度で両端に8~20bp程度のインパーテッドリピートを有し、内部には転移に必要な酵素であるトランスポゼースをコードするものであれば特に制限はない。このようなインサージョンシーケンスを得

るには、W093/18151に開示されている方法に従えばよい。すなわち、1) コリネホルム細菌にプラスミドpEC701を導入して形質転換を行い、2) pEC701により形質転換された株をカナマイシン耐性をマーカーとして選択し、3) プラスミドpEC701を持つコリネホルム細菌をイソプロピルーβ-チオガラクトシド (IPTG) 入りの寒天プレートに塗布し生育した株を選択し、4) 選択した株の保持するプラスミドのクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子の発現調節領域あるいは構造遺伝子領域の塩基配列を解析し、5) 該配列に挿入された配列を見いだすことによりインサージョンシーケンスを含むDNA断片を得ることができる。また、1) コリネホルム細菌にプラスミドpEC901を導入して形質転換を行い、2) pEC901により形質転換された株をカナマイシン耐性をマーカーとして選択し、3) pEC901を持つコリネホルム細菌を30℃で培養し、30℃でもクロラムフェニコール耐性を発現する株を選択し、4) 選択した株の保持するプラスミドのcIリプレッサーの塩基配列を解析し、5) 該配列に挿入された配列を見いだすことによっても取得可能である。

【0019】コリネホルム細菌のインサージョンシーケンスの具体例としては、配列表配列番号1、5及び9に示される3種のインサージョンシーケンス、IS714、IS719、IS903が挙げられる。ここで示す塩基配列は必ずしも厳密なものではなく、インバーテッドリピート配列を含め、その配列中の一部の塩基が別の塩基に置換されたもの、一部の配列が欠失したもの、新たな配列が挿入または付加したものであっても、インサージョンシーケンスとしての機能を有する限り、人工トランスポゾンの構築に使用することができる。

【0020】これらのインサージョンシーケンスをベースとして種々の型の人工トランスポゾンが作製できる。これらの人工トランスポゾンの構造を図1に示す。このうち、本発明で使用する人工トランスポゾンは、インサージョンシーケンスの内部に薬剤耐性遺伝子及び増幅されるべき所望の遺伝子が挿入された構造を有する。配列番号1に示されるIS714の場合、37番目から42番目の位置に制限酵素NheI切断部位があり、この位置に塩基の挿入が起こってもインバーテッドリピート及びトランスポゼースの機能を損なわないので、薬剤耐性遺伝子及び増幅されるべき所望の遺伝子を導入する位置として適している。配列番号5に示されるIS719の場合、37番目から42番目の位置に制限酵素NheI切断部位があり、この位置に塩基の挿入が起こってもインバーテッドリピート及びトランスポゼースの機能を損なわないので、薬剤耐性遺伝子及び増幅されるべき所望の遺伝子を導入する位置として適している。配列番号9に示されるIS903の場合、34番目から48番目の位置に制限酵素XcmI切断部位があ

り、この位置に塩基の挿入が起こってもインバーテッドリピート及びトランスポゼースの機能を損なわないので、薬剤耐性遺伝子及び増幅されるべき所望の遺伝子を導入する位置として適している。

【0021】以下、IS714を例にして、カナマイシン (ネオマイシン)、クロラムフェニコール及びテトラサイクリン等の薬剤に耐性な遺伝子を挿入した人工トランスポゾンの構築方法、さらにこの薬剤耐性遺伝子に加えてアミノ酸や核酸の生産に有用な所望の遺伝子 (例えばアスパルトキナーゼ遺伝子など) を挿入した人工トランスポゾンの構築方法について説明する。

【0022】(1) カナマイシン耐性遺伝子を搭載した人工トランスポゾンの構築

コリネホルム細菌の野生型株であるプレバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ12036 (FERM BP-734) 由来のインサージョンシーケンスであるIS714の配列を持つプラスミドpEC701-IS14 (W093/18151参照) を制限酵素PvuIIとEcoRIで切断することによって、IS714を含む1.6 kbの断片を得る。一方、コリネホルム細菌由来の温度感受性複製起点を有するプラスミドpHSC4 (特開平5-7491号参照) の制限酵素SalI部位にIS714を含む断片を挿入し、プラスミドpHIS714を作製する。このpHIS714のSmaI部位にさらにもう一つ、先に得たIS714を含む1.6 kbの断片を挿入し、正逆方向に二つのIS714断片を含むプラスミドpHTN7141及びpHTN7142を作製する (図2)。ついで、pHTN7141及びpHTN7142をそれぞれ制限酵素PvuIIで切断することによりIS714の配列2つとpHSC4のコリネホルム細菌内における温度感受性複製起点の配列を含む断片を切り出すことができる。一方、プラスミドベクターpHSG298 (宝酒造社製) にも制限酵素PvuII部位が2カ所あり、制限酵素PvuIIで切断することにより、ネオマイシンフォスフトランスフェラーゼ遺伝子 (カナマイシン耐性遺伝子でもある) を含む2.3 kbの大きさの断片を得ることができる。そこで、pHTN7141ならびにpHSG298を制限酵素PvuIIで切断後、ライゲーションを行い、プレバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ12036を形質転換する。形質転換体の中でカナマイシンに対して耐性を示す株からプラスミドpHTN7143を得る (図3)。

【0023】同様の方法により、プラスミドpHTN7142とpHSG298よりプラスミドpHTN7144を得る (図4)。pHTN7143及びpHTN7144は2つのIS714の間にネオマイシンフォスフトランスフェラーゼ遺伝子が挟まれた構造となっている。また、同様の方法により、プラスミドpHIS714とpHSG298よりプラスミドpHIS714K1及びpHIS714K2を対照区として作製する (図

5)。pHIS714K1とpHIS714K2とはネオマイシンフォスフォトランスフェラーゼ遺伝子を含む挿入断片の向きが正逆の関係にある。

【0024】次に、人工トランスポソンの小型化のために、1つのIS714内にネオマイシンフォスフォトランスフェラーゼ遺伝子を挿入した人工トランスポソンの作製を行う。IS714中にはトランスポゼースの機能を損なわない位置に制限酵素NheI部位が存在する。そこでプラスミドpHIS714を制限酵素NheIで切断し、その末端を平滑末端化する。一方、プラスミドpUC4K（ファルマシア バイオテック社製）からネオマイシンフォスフォトランスフェラーゼ遺伝子領域を制限酵素PstIによって切り出し、その末端を平滑末端とする。両者をライゲーションし、目的プラスミドpHTN7145を得る（図6）。

【0025】（2）クロラムフェニコール耐性遺伝子を搭載した人工トランスポソンの構築

プラスミドベクターpHSG398（宝酒造社製）を制限酵素AclIで切断することによりクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子を含む約1.1 kbの大きさの断片を得ることができる。次にこのAclI断片をpUC18（宝酒造社製）のSmaI部位に挿入したものをクローン化する。目的のクローンを選択し、プラスミドpUC18-CMを得る。さらにpUC18-CMよりEcoRIとHindIIIで切り出したクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子を含む約1.1 kbの大きさの断片と先に構築したpHIS714K2のIS714中の転移機能には関係しない位置に存在する制限酵素NheI部位を平滑末端化したものとをライゲーションし、エシェリヒア・コリを形質転換し、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子断片が挿入されたクローンを選択する。得られたクローンより目的プラスミドpHTN7151を得ることができる（図7）。

【0026】（3）テトラサイクリン耐性遺伝子を搭載した人工トランスポソンの構築

プラスミドベクターpBR322（宝酒造社製）を制限酵素EcoRIとAvaIで切断することによりテトラサイクリン耐性遺伝子を含む約1.4 kbの大きさの断片を得ることができる。このDNA断片と先に構築したpHIS714K2のIS714中の転移機能には関係しない位置に存在する制限酵素NheI部位を平滑末端化したものとをライゲーションし、エシェリヒア・コリを形質転換し、テトラサイクリン耐性遺伝子断片が挿入されたクローンを選択する。得られたクローンより目的プラスミドpHTN7152を得ることができる（図8）。

【0027】（4）テトラサイクリン耐性遺伝子が搭載された人工トランスポソンへのリジン生合成遺伝子の一つであるアスパルトキナーゼ遺伝子の挿入

図8で構築したpHTN7152にはアスパルトキナーゼ遺伝子を挿入する良い制限酵素部位がないため、新たに挿入部位を導入したpHTN7156を以下のようにして構築する。プラスミドベクターpBR322（宝酒造社製）を制限酵素EcoRIとAvaIで切断することによりテトラサイクリン耐性遺伝子を含む約1.4 kbの大きさの断片を得ることができる。このDNA断片とプラスミドベクターpHY300PLK（宝酒造社製）を制限酵素SmaIで切断したものとをライゲーションし、エシェリヒア・コリを形質転換し、テトラサイクリン耐性遺伝子断片が挿入されたクローンを選択する。得られたクローンよりプラスミドpHY300-TCを得る。さらにpHY300-TCを制限酵素EcoRIとXbaIで切断することによって得たテトラサイクリン耐性遺伝子を含む断片と、先に構築したpHIS714K2のIS714中の転移機能には関係しない位置に存在する制限酵素NheI部位を平滑末端化したものとをライゲーションし、エシェリヒア・コリを形質転換し、テトラサイクリン耐性遺伝子断片が挿入されたクローンを選択する。得られたクローンより目的プラスミドpHTN7156を得る（図9）。

【0028】次に、プラスミドpHTN7156にリジン生合成遺伝子の一つであるアスパルトキナーゼ遺伝子を以下のようにして挿入する。コリネホルム細菌であるブレヴィバクテリウム・ラクトファーメンタムのリジン生産性変異株に由来し、リジンとスレオニンの協奏阻害に対して脱感作型であるアスパルトキナーゼ遺伝子を含むプラスミドp399AK9B（W094/25605参照）を制限酵素BamHIで切断し、セルフライゲーションを行うことにより、コリネホルム細菌内で機能する複製起点を除いたpHSG399AKを構築する。このpHSG399AKを制限酵素EcoRIとSphIで切断して、約1.7 kbのアスパルトキナーゼ遺伝子断片を得、これをテトラサイクリン耐性遺伝子が搭載された人工トランスポソンを持つプラスミドpHTN7156の制限酵素BglII部位を平滑化したところに挿入し、プラスミドpHTN7156-Cを構築する（図9）。

【0029】（5）トランスポゼースをトランスポソンから切り離したユニットからなるテトラサイクリン耐性遺伝子を搭載した人工トランスポソンの構築

プラスミドpHIS714より、制限酵素NheI及びXbaIによって切り出されるIS714のトランスポゼース遺伝子を含む断片を取得し、プラスミドベクターpUC19のXbaIサイトにクローニングして、プラスミドTnpL/pUC19を構築する。次に、TnpL/pUC19を制限酵素MroIとXbaIで切断することによって、IS714の終止コドンと3'側インバーテッドリピート（IR）を含む配列を除去し、代わりに終止コドンのみを再生させるようにデザインされた合成二本鎖DNAを挿入する。この操作によりIRが



隣接していないトランスポゼース遺伝子を取得する。次にこのORF L/pUC19を制限酵素Sma IとXba Iで切断し、トランスポゼース遺伝子を含む約1.5 kbの断片を取得する。このトランスポゼース遺伝子断片をプラスミドベクターpHY300PLKのSma IからXba Iの間を除去したところに挿入した後に、さらに制限酵素EcoRIとKpnIで切り出す。プラスミドベクターpHSG398を制限酵素PvuIIによって部分分解し、マルチクローニングサイトを含む断片を除いたところに、前述のpHY300PLKより切り出したトランスポゼース遺伝子断片を平滑末端化した後、ライゲーションし、プラスミドpORF1を構築する(図10)。

【0030】一方、プラスミドpHIS714より制限酵素NheI及びXbaIによって切り出されるIS714のトランスポゼース遺伝子を含む断片を取得した後、平滑末端化し、プラスミドベクターpUC19のPst Iサイトを平滑末端化したところにクローニングして、プラスミドTnp (Pst) /pUC19を構築する。このTnp (Pst) /pUC19上でトランスポゼース遺伝子中の一部の塩基置換をU. S. E. Mutagenesis kit (ファルマシア バイオテク社製)を用いて行う。置換した塩基は配列番号1に示されるIS714の288番目の塩基にあたるGであり、これをCに変更する。塩基置換の行われたプラスミドをTnp (Pst) M/pUC19と命名する。Tnp (Pst) M/pUC19の構造は図11に示されている。\*は導入された変異を示している。

【0031】転移因子の転移はさまざまな形で調節を受けている。例えば、以下のものがある (Mobile DNA. American Society for Microbiology, Washington D.C. (1989))。

1) 転移因子内にトランスポゼースに加えてトランスポゼースのインヒビターやリプレッサーが並んでコードされている (例えばTn3)。

2) インフレームでORFが2つ存在し、そのうち3'側のORFがインヒビターをコードする。2つのORF間で低頻度に翻訳のフレームシフトが起こり、これによって2つのORFが連続して翻訳されトランスポゼースが生成する (例えばIS1)。

3) トランスポゼースがコードされているORFの内部に、別の開始コドン (ATG, GTG) が存在し、そこから翻訳が開始しインヒビターが産生される (例えばTn5 (IS50))。

【0032】ところでIS714には、そのほぼ全長にわたって1つのORFが存在しており、そのほかに長いORFは見いだされない。このことから、IS714はTn5のように、トランスポゼースをコードするORFを有し、一方その内部に存在する別の開始コドンよりインヒビターが翻訳される可能性がある。プロモーター様

配列の検索を行ったところ、IS714の配列上では286番目から288番目の塩基にあたるGTGの配列がインヒビターの開始コドンに当たる可能性があることが判明した。つまり、Tnp (Pst) M/pUC19上に導入された変異は、インヒビターの翻訳を開始させないためのものである。

【0033】pORF1上でトランスポゼース前半部分遺伝子上にある制限酵素サイトSma IとNae Iの間を除去したところに、Tnp (Pst) M/pUC19を制限酵素Sma IとNae Iで切断することによって得られるトランスポゼース前半部分遺伝子断片をライゲーションし、pORF2を構築する。pORF2のSma IサイトからXba Iサイトの間を除去して平滑末端化したところに、pBSF2-SD7 (WO92/14832) から制限酵素Nae IとHindIIIを用いて切り出したトリプトファンオペロンアテニューエーターを含む遺伝子断片を、平滑末端化した後に挿入する。ここで構築したプラスミドをpORF3と命名する。pORF3を制限酵素Sal IとBpu1102Iで切断して、トランスポゼース前半部分遺伝子断片を除いたところに、Tnp (Pst) /pUC19を制限酵素Sal IとBpu1102Iで切断して得られたトランスポゼース前半部分遺伝子断片をライゲーションし、pORF4を構築する (図11)。

【0034】TnpL/pUC19をSac Iで切断した後に、BAL31ヌクレアーゼで30℃、20分間分解し、トランスポゼース遺伝子の開始コドン近傍を上流側から削除する。その後、そのトランスポゼース遺伝子をSph Iサイトを利用して切り出し、pHSG398をSma IとSph Iで切断したところに挿入する。このようにして構築できたプラスミドをdelTnp5/398と命名する。delTnp5/398を制限酵素Kpn IとHindIIIで切断して取得したトランスポゼース前半部分遺伝子断片を平滑末端化した後に、プラスミドベクターpKK233-2 (ファルマシア バイオテク社製)をNco IとHindIIIで切断して平滑末端化したところにライゲーションし、pTrc-ORFを構築する。pTrc-ORFをSsp IとBpu1102Iで切断することによって得られるTrcプロモーターとトランスポゼース前半部分遺伝子を含む断片を、pORF3をXba Iで切断して平滑末端化した後に、更にBpu1102Iで切断してそのトランスポゼース前半部分遺伝子断片を除去したところに挿入してpORF7を構築する (図12)。

【0035】また、delTnp5/398を制限酵素Kpn IとHindIIIで切断して取得したトランスポゼース前半部分遺伝子断片を、プラスミドベクターpUC18のKpn IとHindIIIの間にクローニングする。そのプラスミド (delTnp5/18) のBsm IとNae Iの間を除去して、Tnp (Pst) M/p

UC19を制限酵素BsmIとNaeIで切断することによって得られるトランスポゼース前半部分遺伝子断片をライゲーションし、delTnp5M/18を構築する。delTnp5M/18をKpnIとHindIIIで切断することによって得られるトランスポゼース前半部分遺伝子断片を、pKK233-2をNcoIとHindIIIで切断して平滑末端化したところにライゲーションし、pTrec-TnpMを構築する。pTrec-ORFからpORF7を構築する方法と同様の方法を用いて、pTrec-TnpMとpORF3よりpORF8を構築する(図13)。

【0036】これまでのプラスミドpORF3、pORF4、pORF7、pORF8を材料にコリネ型細菌への導入用の各プラスミドの構築を行う。以下にpORF3からpORF41を構築する手順を示す。まず、pHIS714をNheIとSacIIで切断し、トランスポゼース遺伝子の大部分を除去したところに、クローニングサイト造成のためにデザインした二本鎖合成DNAを挿入し、pHTN7160を構築する。pHTN7160を制限酵素KpnIで切断し平滑末端化した後に、更にBglIで切断することによってIS714の両側のIRとコリネ型細菌内で機能する温度感受性複製起点を含む遺伝子断片を取得する。また、pORF3を制限酵素EaRIで切断し平滑末端化した後に、更にBglIで切断する。そこに上記pHTN7160由来断片を挿入し、pORF41-preを構築する。次に、pORF41-preをIS714の両端のIRに挟まれる位置に存在するEcoRI■サイトで切断したところに、プラスミドベクターpBR322より制限酵素EcoRIとAvaIを利用して切り出したテトラサイクリン耐性遺伝子を平滑末端化したものを挿入し、pORF41を構築する(図14)。

【0037】同様の方法を利用して、pORF4からはpORF31-preを経由してpORF31を、pORF7からはpORF71-preを経由してpORF71を、pORF8からはpORF81-preを経由してpORF81を構築する。また、pORF3をXbaIとEaRIで切断した後に平滑末端化し、セルフライゲーションさせpORFC0を構築する(図15)。pORF3よりpORF41を構築する場合と同様の方法でpORFC0よりpORFC2-preを経由してpORFC2を構築する。

【0038】これらの最終構築プラスミド上にはトランスポゼースの構造遺伝子、クロラムフェニコール耐性遺伝子、大腸菌内で機能する複製起点、コリネ型細菌内で機能する温度感受性複製起点、及びIS714由来の両端のインバーテッドリピート(IR)に挟まれたテトラサイクリン耐性遺伝子が存在する。ただし、pORFC2に関してはトランスポゼースの構造遺伝子は存在しない。

【0039】IS714の両端のIRとテトラサイクリン耐性遺伝子のユニットをトランスポゾンユニットTn7162と命名する。IS714自身、あるいは先に記述したTn7152等は転移可能な領域の遺伝子内にトランスポゼースの構造遺伝子を有しているのに対して、Tn7162は転移可能な領域内にトランスポゼースの構造遺伝子を有していないのが特徴である。この場合にはTn7162が搭載されている同じベクター上のユニット外に存在するトランスポゼース遺伝子より発現されるトランスポゼースによって転移が起これと考えられる(図16)。あるいは、染色体上に存在するトランスポゼース遺伝子より発現されるトランスポゼースによって転移が起これと考えられる。

【0040】次にトランスポゾンユニットを搭載せずに、トランスポゼース遺伝子のみが搭載されたコリネ型細菌への導入用プラスミドの構築を行う。プラスミドpHIS714K1をEcoO109IとMroIで切断することによって、IS714を除去した後、セルフライゲーションを行い、pHIS714Kdelを構築する。一方、pORF3を制限酵素EaRIで切断し平滑末端化した後に、更にBglIで切断する。そこにpHIS714Kdelを制限酵素KpnIで切断し平滑末端化した後に、更にBglIで切断することによって得られるコリネ型細菌内で機能する温度感受性複製起点を含む断片をライゲーションして、pORF40を構築する(図17)。同様の操作を行って、pORF4からはpORF30を、pORF7からはpORF70を、pORF8からはpORF80を、pORFC0からはpORFC1を構築する。

【0041】上記のIS714以外に、配列表配列番号5及び9にそれぞれ示される塩基配列を有するIS719及びIS903その他のコリネホルム細菌由来のインサージョンシーケンスについても、インサージョンシーケンス内部のトランスポゼース遺伝子の発現調節領域及び構造遺伝子領域外に存在する適当な制限酵素部位に、クロラムフェニコール耐性遺伝子やテトラサイクリン耐性遺伝子等の薬剤耐性遺伝子及びアスパルトキナーゼ遺伝子等の所望の遺伝子を挿入することにより、人工トランスポゾンを構築することができる。トランスポゼース遺伝子の発現調節領域及び構造遺伝子領域外に適当な制限酵素部位がない場合には、トランスポゼース機能を損なわない領域において、ポリメラーゼ・チェイン・リアクション法(PCR法)または合成DNAオリゴヌクレオチド(アダプター)により部位特異的変異または遺伝子挿入を行うことによって、塩基配列を改変し適当な制限酵素部位を予め作製すればよい。

【0042】かくして構築した人工トランスポゾンは、適切なベクター、例えばプラスミドに搭載して宿主であるコリネホルム細菌に導入される。人工トランスポゾンを搭載するプラスミドとしては、特に制限はないが、通

常コリネホルム細菌由来のプラスミドを用いればよい。具体的には、pHM1519 (Agric. Biol. Chem., 48, 2901-2903 (1984))、pAM330 (Agric. Biol. Chem., 48, 2901-2903 (1984))、及びこれらを改良した薬剤耐性遺伝子を有するプラスミド等である。さらに、導入された人工トランスポソンを効率よく染色体上で増幅させるには、上記(1)に記載したような温度感受性複製起点を有するプラスミドを用いることが好ましい(特開平5-7491号参照)。人工トランスポソンを搭載したプラスミドをコリネホルム細菌に導入する方法としては、通常よく用いられるプロトプラスト法(Gene, 39, 281-286 (1985))、エレクトロポレーション法(Bio/Technology, 7, 1067-1070 (1989))等の方法を用いればよい。

【0043】人工トランスポソンを温度感受性プラスミドに搭載してコリネホルム細菌へ導入する場合、構築したプラスミドでコリネホルム細菌を形質転換し、プラスミドの複製が可能な25℃で培養することにより、一細胞当たり数十～数百コピーの人工トランスポソン搭載プラスミドを増幅させて染色体への導入を行い、その後34℃で培養することにより余分なプラスミドを除去すればよく、この方法により効率よく染色体上での遺伝子の増幅が起こる。温度感受性プラスミドを用いずに正常なプラスミドを用いることもできるが、染色体への導入後に余分なプラスミドを除去することが困難となる場合が多い。その他、人工トランスポソンのみのDNA断片やコリネホルム細菌中で複製できないプラスミドベクター(例えばエシェリヒア・コリで複製するプラスミドベクター等)を用いてコリネホルム細菌の染色体に導入する方法もある(特開平7-107976号、Vertes, A. A., Asai, Y., Inui, M., Kobayashi, M., Kurusu, Y. and Yukawa, H.: Mol. Gen. Genet., 245, 397-405 (1994))が、この方法は形質転換後に宿主菌体内、宿主染色体外でDNA断片を増幅できず、宿主染色体への転移効率が極めて悪い。

【0044】染色体に所望の遺伝子が導入された株やさらに該遺伝子が染色体上で増幅された株を選択する方法としては、所望の遺伝子と共に導入された薬剤耐性遺伝子の薬剤耐性度を利用する方法が用いられる。利用される薬剤耐性遺伝子は、カナマイシン、クロラムフェニコール及びテトラサイクリン耐性遺伝子の他、アンピシリンやメトロキサセト耐性遺伝子等の種々の薬剤に耐性な遺伝子が挙げられるが、特に薬剤耐性度と薬剤耐性遺伝子のコピー数が相関関係にある薬剤耐性遺伝子が最も好ましい。すなわち、より高濃度の薬剤の存在下に生育可能なクローンから所望の遺伝子が染色体上で増幅された株を取得することができる。

【0045】構築したテトラサイクリン耐性遺伝子等の薬剤耐性遺伝子と脱感作型アスパルトキナーゼ遺伝子等の所望の遺伝子を含む人工トランスポソンを搭載したプ

ラスミド(例えばpHTN7156-C)を用いてコリネホルム細菌を形質転換し、人工トランスポソンの宿主染色体への転移を行った後、転移により生じた染色体上の転移コピー数の評価を以下の方法により行うことができる。形質転換体をテトラサイクリン(Tc)等の選択薬剤の適切な濃度(Tcの場合1~20 µg/ml)を含む上記CM2G(酵母エキス10g/l、トリプトン10g/l、グルコース5g/l及びNaCl 5g/l)液体培地中に25℃で一晩培養後、0.9% NaCl液で適宜希釈して、薬剤の適切な範囲の濃度を含む上記CM2G寒天培地に100 µlずつ塗布する。これらを34℃で培養し、出現したコロニーをそれぞれランダムに数クローンずつ選び、染色体DNAを調製し、PvuIIを始めとした適当な種々の制限酵素で完全に消化し、アガロースゲル電気泳動を行い、ニトロセルロースあるいはナイロン、ポリビニリデンジフルオリド(PVDF)等のフィルターにプロッティングする。このフィルターを<sup>32</sup>P-ラベルしたテトラサイクリン耐性遺伝子断片をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションし、プローブとハイブリダイズするバンドの数を検定する。

【0046】かくして得られた染色体上において所望の遺伝子が増幅した形質転換体は、通常用いられている方法や条件に従って培養すればよい。培養のための培地としては、炭素源、窒素源、無機イオン等を含む通常の培地である。また、必要に応じ、ビタミン、アミノ酸等の有機微量栄養素を添加することが望ましい。炭素源としては、グルコースやシュクロース等の炭水化物、酢酸等の有機酸、エタノール等のアルコール類、その他が適宜使用される。窒素源としては、アンモニアガス、アンモニア水、アンモニウム塩、その他が用いられる。無機イオンとしては、マグネシウムイオン、磷酸イオン、カリウムイオン、鉄イオン、その他が必要に応じ適宜使用される。培養は、好気条件下にpH5.0から8.5、温度を15℃から37℃の適当な範囲に制御しつつ、1ないし7日間程度培養を行う。人工トランスポソンを用いて遺伝子が増幅された結果、目的有用物質の生産効率が上昇しており、培養物中には、菌体内または菌体外に目的物質が著量生成蓄積される。培養物からの目的物質の採取は、公知の方法により行うことができる。

【0047】

【実施例】以下、本発明を実施例によりさらに詳細に説明する。

【0048】【実施例1】

IS714を用いたカナマイシン耐性遺伝子を含む人工トランスポソンの構築

コリネホルム細菌由来のインサーションシーケンスであるIS714の配列を持つプラスミドpEC701-IS14を制限酵素PvuIIとEcoRIで切断することによってIS714を含む1.6 kbの断片を得た。

なお、プラスミドpEC701-IS14を保持するブレバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ12684は、平成4年3月10日付で受託番号FERM P-12863のもとに通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所(郵便番号305日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号)に寄託され、平成5年3月9日付でブダペスト条約に基づく寄託に移管され、受託番号FERM BP-4232が付与されている。一方、複製機能が温度感受性になった変異型プラスミドpHSC4の複製に関与しない位置に存在する制限酵素SmaI部位にIS714を含む断片を両者ともクレノーフラグメント処理で平滑末端化した後、ライゲーションによって挿入し、プラスミドpHIS714を作製した(図2)。なお、プラスミドpHSC4を保持するエシェリヒア・コリ AJ12571は、平成2年10月11日付で受託番号FERM P-11763のもとに通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所(郵便番号305日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号)に寄託され、平成3年8月26日付でブダペスト条約に基づく寄託に移管され、受託番号FERM BP-3524が付与されている。このpHIS714のSmaI部位にさらにもう一つ、先に得たIS714を含む1.6kbの断片をクレノーフラグメント処理で平滑末端化した後、ライゲーションによって挿入し、プラスミドpHTN7141及びpHTN7142を作製した(図2)。制限酵素切断による解析の結果、このプラスミドpHTN7141は2カ所に挿入したIS714を含む断片は同方向であり、プラスミドpHTN7142は逆方向であった。

【0049】pHTN7141及びpHTN7142をそれぞれ制限酵素PvuIIで切断することにより、IS714の配列2つとpHSC4のコリネホルム細菌内における温度感受性複製起点の配列を含む断片を切り出すことができる。一方、プラスミドベクターpHSG298(宝酒造社製)にも制限酵素PvuII部位が2カ所あり、制限酵素PvuIIで切断することによりネオマイシンフォスフォートランスフェラーゼ遺伝子(カナマイシン耐性遺伝子)を含む2.3kbの大きさの断片を得ることができる。そこで、pHTN7141ならびにpHSG298を制限酵素PvuIIで切断した後にライゲーションを行い、ブレバクテリウム・ラクトファーメンタムAJ12036を形質転換した。形質転換体の中で、カナマイシン(Km)25µg/mlに対して耐性を示す株からプラスミドpHTN7143を得た(図3)。プラスミドpHTN7143を保持するブレバクテリウム・ラクトファーメンタムAJ12826は、平成5年3月9日付で通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所(郵便番号305日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号)にブダペスト条約に基づき寄託され、受託番号FERM BP-4231が付与されている。同様の方法でpHTN7142とpHSG298よりプラスミド

pHTN7144を得た(図4)。pHTN7143及びpHTN7144は、IS714の2つのIS714の間にネオマイシンフォスフォートランスフェラーゼ遺伝子が挟まれた構造からなる。さらに同様の方法により、プラスミドpHIS714とpHSG298よりプラスミドpHIS714K1及びpHIS714K2を対照区として作製した(図5)。ここでpHIS714K1とpHIS714K2とはネオマイシンフォスフォートランスフェラーゼ遺伝子を含む挿入断片が正逆の関係にある。

【0050】次に人工トランスポソンの小型化を目指して、1つのIS714内にネオマイシンフォスフォートランスフェラーゼ遺伝子を挿入した人工トランスポソンの作製を行った。IS714中にはトランスポゼースの機能を損なわない位置に制限酵素NheI部位が存在する。そこでプラスミドpHIS714を制限酵素NheIで切断し、その末端を平滑末端化した。一方、プラスミドpUC4K(ファルマシアバイオテック社製)からネオマイシンフォスフォートランスフェラーゼ遺伝子領域を制限酵素PstIによって切り出し、その末端を平滑末端とした。両者をライゲーションし、得られたプラスミドをpHTN7145と命名した(図6)。プラスミドpHTN7145を保持するエシェリヒア・コリ AJ13128は、平成7年6月29日付で通産省工業技術院生命工学工業技術研究所(郵便番号305日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号)に寄託され受託番号FERM P-15011が付与されている。同株は、平成8年5月14日付でブダペスト条約に基づく寄託に移管され、受託番号FERM BP-5537が付与されている。

【0051】人工トランスポソンの転移機能の評価  
このようにして作製した人工トランスポソンの転移機能を以下のようにして評価した。クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子を持つプラスミドpAJ43をブレバクテリウム・ラクトファーメンタムAJ12036に保持させた株を人工トランスポソンを搭載したプラスミドpHTN7145で形質転換し、共存状態とした。なお、pAJ43を保持するエシェリヒア・コリ AJ11882は、昭和57年4月28日付で受託番号FERM P-6517のもとに通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所(郵便番号305日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号)に寄託され、昭和57年5月22日付でブダペスト条約に基づく寄託に移管され、受託番号FERM BP-136が付与されている。上記のようにして得たpHTN7145とpAJ43を同時に保持するブレバクテリウム・ラクトファーメンタムをKm25µg/ml、クロラムフェニコール(Cm)5µg/mlを含むCM2G培地(酵母エキス10g/l、トリプトン10g/l、グルコース5g/l及びNaCl5g/l)で25℃で一晩振とう培養後、培養液を適

宜希釈してKm 25  $\mu$ g/ml、Cm 5  $\mu$ g/mlを含むCM2 G寒天培地に塗布し、34℃で培養した。出現したコロニーのうち100株についてプラスミドを抽出し、その大きさを電気泳動によって調べたところ、そのうちの3株でpHTN7145、pAJ43の両プラスミドと分子量が異なり、pAJ43と人工トランスポソンの分子量の和の大きさになっているプラスミドが存在していた。これらのプラスミドを制限酵素切断によって解析したところ、pAJ43にpHTN7145上の配列が挿入されたものであることが分った。このうちの1株について、挿入を受けたpAJ43上の挿入断片とpAJ43との連結部分の近傍の塩基配列をダイデオキシ法によって決定したところ、人工トランスポソンの両末端の配列が存在すること、ならびに挿入を受けたpAJ43のターゲット配列GGTTTATT（配列番号12）が重複していることが確認された。これらの結果から、1つのIS714内に転移機能に関与しない遺伝子（ここではネオマイシンフォスフトランスフェラーゼ遺伝子）を挿入した形のトランスポソン構造をとらせた場合に、

その構造が保存されたまゝいわゆるトランスポソンの如くに転移することが示された。

#### 【0052】人工トランスポソンの転移頻度の評価

対照プラスミドをpHIS714K1とし、人工トランスポソンを搭載したpHTN7143、pHTN7144及びpHTN7145を用いて、プレバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ12036を形質転換し、人工トランスポソンの宿主染色体への転移の頻度を評価した。それぞれの形質転換体をKm 25  $\mu$ g/mlを含む上記CM2 G液体培地中に、25℃で一晩培養後、0.9%NaCl液で適宜希釈してKm 25  $\mu$ g/mlを含むCM2 G寒天培地に100  $\mu$ lずつ塗布した。34℃及び25℃で培養し、各温度におけるKm耐性株の出現頻度をコロニー数により計測し、34℃でのコロニー数を25℃でのコロニー数で割った値を転移頻度とした。その結果を表1に示す。

#### 【0053】

【表1】

転移因子または 人工トランスポソン	転移頻度	相対比
IS714	1. 85 X 10 <sup>-5</sup>	1
Tn7143	3. 52 X 10 <sup>-5</sup>	1. 9
Tn7144	2. 38 X 10 <sup>-5</sup>	1. 3
Tn7145	2. 08 X 10 <sup>-5</sup>	11. 2

【0054】この結果より、対照区のIS714（pHIS714K1上に搭載）に比し、人工トランスポソンTn7143（pHTN7143上に搭載）やTn7144（pHTN7144上に搭載）は、その宿主染色体への転移頻度がせいぜい1～2倍であったが、人工トランスポソンTn7145（pHTN7145上に搭載）型は約11倍と極めて効率的な人工トランスポソンであることが示された。

#### 【0055】【実施例2】

#### IS714を用いたクロラムフェニコール耐性遺伝子を含む人工トランスポソンの構築

プラスミドベクターpHSG398（宝酒造社製）を制限酵素AccIIで切断することによりクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子を含む約1.1 kbの大きさの断片を得た。このAccII断片をpUC18（宝酒造社製）のSmaI部位に挿入、クローン化した。すなわち、Cm 25  $\mu$ g/mlとアンピシリン（Ap）100  $\mu$ g/mlを含むL培地（トリプトン10g/l、酵母エキス5g/l及びNaCl 5g/l）に生育したエシェリヒア・コリ形質転換体より、目的のクローンを選択し、そのプラスミドをpUC18-CMと命名した。さらにpUC18-CMよりEcoRIとHindIIIで切り出したクロラムフェニコールアセチルトランスフェ

ラーゼ遺伝子を含む約1.1 kbの大きさの断片を平滑末端化し、このDNA断片と実施例1において構築したpHIS714K2のIS714中の転移機能には関係しない位置に存在する制限酵素NheI部位をクレノーフラグメント処理で平滑末端化したものとをライゲーションし、エシェリヒア・コリを形質転換し、Cm 25  $\mu$ g/mlとKm 50  $\mu$ g/mlを含むL培地に生育するコロニーを得、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子断片が挿入されたクローンを選択した。本クローンが保持するプラスミドをpHTN7151と命名した（図7）。プラスミドpHTN7151を保持するエシェリヒア・コリ AJ13129は、平成7年6月29日付で通産省工業技術院生命工学工業技術研究所（郵便番号305 日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号）に寄託され受託番号FERM P-15012が付与されている。同株は、平成8年5月14日付でブダペスト条約に基づく寄託に移管され、受託番号FERM BP-5538が付与されている。

#### 【0056】人工トランスポソンの転移によって生じる染色体上のコピー数の評価

pHTN7151を用いて、プレバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ12036を形質転換し、人工トランスポソンの宿主染色体への転移によって生じる染

染色体上のコピー数を以下の方法により評価した。得られた形質転換体をCm3  $\mu$ g/mlを含む上記CM2G液体培地中に、25℃で一晩培養後、0.9%NaCl液で適宜希釈してCm3  $\mu$ g/mlを含むCM2G寒天培地に100  $\mu$ lずつ塗布し、34℃で培養し、出現したコロニーの中からカナマイシン感受性のクローンを選んだ。このクローンをCm3  $\mu$ g/mlを含む上記CM2G液体培地中に、30℃で一晩培養後、0.9%NaCl液で適宜希釈してCm6  $\mu$ g/mlを含む上記CM2G寒天培地に100  $\mu$ lずつ塗布し、30℃で培養し、出現したコロニーの中からランダムに数クローンを選んだ。各クローンから染色体DNAを調製し、制限酵素PvuIIで完全に消化し、アガロースゲル電気泳動を行い、ポリビニリデンジフルオリド(PVDF)フィルターにブロッティングした。このフィルターを<sup>32</sup>P-ラベルしたクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子断片をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションし、プローブとハイブリダイズするバンドの数を検定した。その結果、ランダムに選んだ4クローン中3クローンにおいて、クロラムフェニコール耐性遺伝子を持つ人工トランスポゾンが宿主染色体上に2コピー転移していることが確認された。

#### 【0057】[実施例3]

#### IS714を用いたテトラサイクリン耐性遺伝子を含む人工トランスポゾンの構築

プラスミドベクターpBR322(宝酒造社製)を制限酵素EcoRIとAvaIで切断することによりテトラサイクリン耐性遺伝子を含む約1.4kbの大きさの断片を得た。次にこのEcoRI-AvaI切断断片をT4DNAポリメラーゼ処理で平滑末端化し、このDNA断片と実施例1において構築したpHIS714K2のIS714中の転移機能には関係しない位置に存在する制限酵素NheI部位をクレノーフラグメント処理で平滑末端化したものとをライゲーションし、エシェリヒア・コリを形質転換し、Tc25  $\mu$ g/mlを含むL培地に生育するコロニーを得、テトラサイクリン耐性遺伝子断片

が挿入されたクローンを選択した。本クローンが保持するプラスミドをpHTN7152と命名した(図8)。プラスミドpHTN7152を保持するエシェリヒア・コリAJ13130は、平成7年6月29日付で通産省工業技術院生命工学工業技術研究所(郵便番号305日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号)に寄託され受託番号FERM P-15013が付与されている。同株は、平成8年5月14日付でブダペスト条約に基づく寄託に移管され、受託番号FERM BP-5539が付与されている。

#### 【0058】人工トランスポゾンの転移によって生じる染色体上のコピー数の評価

pHTN7152を用いて、プレバクテリウム・ラクトファーメンタムAJ12036を形質転換し、人工トランスポゾンの宿主染色体への転移によって生じる染色体上のコピー数を以下のようにして評価した。形質転換体をTc1.5  $\mu$ g/mlを含む上記CM2G液体培地中に、25℃で一晩培養後、0.9%NaCl液で適宜希釈してTcを1.5  $\mu$ g/mlから5  $\mu$ g/mlの範囲で含む上記CM2G寒天培地に100  $\mu$ lずつ塗布し、34℃で培養し、出現したコロニーをそれぞれランダムに数クローンずつ選んだ。各クローンから染色体DNAを調製し、制限酵素PvuIIで完全に消化し、アガロースゲル電気泳動を行い、ポリビニリデンジフルオリド(PVDF)フィルターにブロッティングした。このフィルターを<sup>32</sup>P-ラベルしたテトラサイクリン耐性遺伝子断片をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションし、プローブとハイブリダイズするバンドの数を検定した。その結果、表2に示すように、テトラサイクリン耐性遺伝子をもつ人工トランスポゾンは高頻度で2~3コピーのものが検出された。これより、テトラサイクリン耐性遺伝子を選択薬剤耐性遺伝子として用いることにより、高頻度で目的とする多コピー型の形質転換体を得ることが示された。

#### 【0059】

#### 【表2】

Tc濃度 ( $\mu$ g/ml)	被検クローン数	検出クローン数		
		1コピー	2コピー	3コピー
1. 5	6	4	2	0
2. 0	4	4	0	0
3. 0	4	3	1	0
4. 0	6	2	3	1
5. 0	6	5	1	0

・【0060】Tc4  $\mu$ g/mlに耐性を示し、染色体上に3コピーの人工トランスポゾンが検出されたプレバクテリウム・ラクトファーメンタムAJ13188は、平成

8年5月14日付で通産省工業技術院生命工学工業技術研究所(郵便番号305日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号)にブダペスト条約に基づいて寄託され、受

託番号FERM BP-5536が付与されている。

#### 【0061】[実施例4]

#### IS714を用いたテトラサイクリン耐性遺伝子及びアスパルトキナーゼ遺伝子を含む人工トランスポソンの構築

テトラサイクリン耐性遺伝子が搭載された人工トランスポソンのリジン生合成遺伝子の一つであるアスパルトキナーゼ遺伝子を以下のようにして挿入した。プラスミドベクターpBR322（宝酒造社製）を制限酵素EcoRIとAvaIで切断することにより、テトラサイクリン耐性遺伝子を含む約1.4 kbの大きさのDNA断片を得た。このEcoRI-AvaI切断断片をT4 DNAポリメラーゼ処理で平滑末端化し、得られたDNA断片とプラスミドベクターpHY300PLK（宝酒造社製）を制限酵素SmaIで切断したものとをライゲーションし、得られた組換えDNAでエシェリヒア・コリを形質転換し、Tc 25 µg/mlを含むL培地に生育するコロニーを得、テトラサイクリン耐性遺伝子断片が挿入された組換えDNAが導入された株を選択した。同株が有するプラスミドをpHY300-TCと命名した。さらにpHY300-TCを制限酵素EcoRIとXbaIで切断することによって得たpBR322由来のテトラサイクリン耐性遺伝子を含む断片をクレノーフラグメント処理で平滑末端化し、このDNA断片と先に構築したpHIS714K2のIS714中の制限酵素NheI部位をクレノーフラグメント処理で平滑末端化したものとをライゲーションし、エシェリヒア・コリを形質転換し、Tc 25 µg/mlを含むL培地に生育するコロニーを得、テトラサイクリン耐性遺伝子断片が挿入されたクローンを選択した。本クローンが保持するプラスミドをpHTN7156と命名した（図9）。

【0062】一方、プレバクテリウム・ラクトファーマンタムのリジン生産性変異株に由来し、リジンとスレオニンの協奏阻害に対して脱感作型であるアスパルトキナーゼ遺伝子を含むプラスミドp399AK9Bを保持するエシェリヒア・コリ AJ12691（W094/25605）は、平成4年4月10日付で通産省工業技術院生命工学工業技術研究所（郵便番号305 日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号）に寄託され、受託番号FERM P-12198が付与されている。同株は、平成7年2月10日付でブダベスト条約に基づく寄託に移管され、受託番号FERM BP-4999が付与されている。このp399AK9Bを制限酵素BamHIで切断し、セルフライゲーションを行い、コリネホルム細菌内で機能する複製起点を除いたpHSG399AKを構築した。このpHSG399AKを制限酵素EcoRIとSphIで切断して、約1.7 kbのアスパルトキナーゼ遺伝子断片を得、これをT4 DNAポリメラーゼ処理で平滑末端化した後、テトラサイクリン耐性遺伝子が搭載された人工トランスポソンの持つプラスミドpHTN

7156の制限酵素BglII部位をクレノーフラグメント処理で平滑末端化したところに挿入し、プラスミドpHTN7156-Cを構築した（図9）。プラスミドpHTN7156-Cでエシェリヒア・コリを形質転換したエシェリヒア・コリAJ13131は、平成7年6月29日付で通産省工業技術院生命工学工業技術研究所（郵便番号305 日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号）に寄託され、受託番号FERM P-15014が付与されている。同株は、平成8年5月14日付でブダベスト条約に基づく寄託に移管され、受託番号FERM BP-5540が付与されている。

#### 【0063】人工トランスポソンの転移によって生じる染色体上のコピー数の評価

pHTN7156-Cを用いて、プレバクテリウム・ラクトファーマンタムAJ12036あるいはプレバクテリウム・ラクトファーマンタム AJ3445を形質転換し、人工トランスポソンの宿主染色体への転移によって生じる染色体上のトランスポソンのコピー数を評価した。AJ12036株は野生型のアスパルトキナーゼ遺伝子をその染色体上に有することにに対し、AJ3445株はS-2-アミノエチル-L-システイン耐性を示し、リジンとスレオニンの協奏阻害に対して脱感作型であるアスパルトキナーゼ遺伝子を有する。

【0064】プレバクテリウム・ラクトファーマンタムAJ12036株は、昭和59年3月26日付で通産省工業技術院生命工学工業技術研究所（郵便番号305 日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号）に寄託され、受託番号FERM P-7559が付与されている。同株は、昭和60年3月13日付でブダベスト条約に基づく寄託に移管され、受託番号FERM BP-734が付与されている。プレバクテリウム・ラクトファーマンタム AJ3445株は、昭和48年3月2日付で通産省工業技術院生命工学工業技術研究所（郵便番号305 日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号）に寄託され、受託番号FERM P-1944が付与されている。同株は、平成8年5月17日付でブダベスト条約に基づく寄託に移管され、受託番号FERM BP-5541が付与されている。

【0065】まず、形質転換体をTc 0.7 µg/mlを含むCM2G培地（酵母エキス10 g/l、トリプトン10 g/l、グルコース5 g/l及びNaCl 5 g/l）中に、25°Cで一晩培養後、0.9% NaCl液で適宜希釈してTcを1.5 µg/mlから5 µg/mlの範囲で含む上記CM2G寒天培地に100 µlずつ塗布する。それらを34°Cで培養し、出現したコロニーをそれぞれランダムに数クローンずつ選び、Km 25 µg/mlを含むCM2G寒天培地にレプリカし、Km感受性株を選択した。選択されたKm感受性株の染色体DNAを調製し、制限酵素BglIIで完全に消化し、アガロースゲル電気泳動を行い、ポリビニルデンジフルオ

リド (P V D F) フィルターにブロッティングした。このフィルターを<sup>32</sup>-Pラベルしたアスパルトキナーゼ遺伝子断片 (遺伝子後半部分のH i n d IIIサイトからE c o R Iサイトまでの440 b p) をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションし、プローブとハイブリダイズするバンドの数を検定した。その結果、A J 12036を宿主とした場合は解析した10株中4株で、またA J 3445を宿主とした場合には解析した22株中8株で、それぞれトランスポゾンT n 7156-Cが2コピー転移していることが検出された。これより、テトラサイクリン耐性遺伝子を選択薬剤耐性遺伝子として用いることによって、高頻度で有用遺伝子を染色体上に多コピー導入できることが示された。

#### 【0066】人工トランスポゾンを用いてアスパルトキナーゼ遺伝子を転移させた株のリジン生産性の評価

次に、上記人工トランスポゾン転移株におけるリジン生産性の評価を行った。人工トランスポゾン転移株をT c 0.7 μg/mlを含むCM2G寒天培地の全面に塗布し34℃で1晩培養した後、そのうちの6分の1量の菌体をリジン生産培地 (グルコース 100 g/l、硫酸アンモニウム 55 g/l、豆濃 50 ml/l、燐酸

二水素カリウム 1 g/l、硫酸マグネシウム 1 g/l、ビタミンB1 2 mg/l、ビオチン 0.5 mg/l、ニコチン酸アミド 5 mg/l、硫酸鉄 2 mg/l、硫酸マンガン 2 mg/l、水酸化カリウムでpH 7.5に調整、115℃にて15分間オートクレーブの後、炭酸カルシウム50 g/lを添加) 20 mlに植菌し、坂口フラスコにて30℃、72時間培養した培養液のリジン含量を分析し、人工トランスポゾン転移株のリジン生産性を評価した。その結果、表3、4に示すようにA J 12036を親株にした場合とA J 3445を親株にした場合の双方でT n 7156-Cの転移によって、トランスポゾン未転移株と比較してリジンの生産性の上昇が認められた。また、トランスポゾンの転移コピー数 (1コピーと2コピー) に応じて、リジン生産性がより高かった。これより、テトラサイクリン耐性遺伝子を選択薬剤耐性遺伝子として活用して多コピーの有用遺伝子を導入することによって、菌株のアミノ酸生産性を向上させることが可能であることが示された。

#### 【0067】

【表3】

A J 12036を親株としたトランスポゾン転移株のリジン生産性

菌株	Tn7156-C転移コピー数	リジン生産量 (g/l)
AJ12036	0	0.0
Tn7156-Cint-Y1	1	12.8
Tn7156-Cint-Y2	2	18.8

【表4】

A J 3445を親株としたトランスポゾン転移株のリジン生産性

菌株	Tn7156-C転移コピー数	リジン生産量 (g/l)
AJ3445	0	18.7
Tn7156-Cint-06	1	21.3
Tn7156-Cint-019	2	25.2

#### 【0068】

#### 【0069】[実施例5]

##### シャトルベクターpVK7の構築

ブレヴィバクテリウム・ラクトファーマンタムに存在するクリプティックプラスミドとして、pAM330がある。pAM330は特公平1-11280号公報、USP 4,788,762に記載されており、ブレヴィバクテリウム・ラクトファーマンタムATCC13869株から調製される。pAM330はコリネホルム細菌中で増殖可能なシャトルベクターの複製起点として利用可能である。エシェリヒア・コリ用の汎用ベクターであるpHSG299 (宝酒造社製) とpAM330を結合した新規シャトルベクターを構築した。pAM330を制限酵素H i n d IIIにて一ヶ所切断し、切断面をT4DNAポリメラーゼにて平滑末端化した。また、pHSG299を制限酵素A v a IIにて一ヶ所切断し、切断面をT4DNAポリメラーゼにより平滑末端化した。得られた断片をライゲ

ーションし、pAM330とpHSG299が連結したプラスミドを取得した。pVK7の構築の過程を図18に示す。pVK7はエシェリヒア・コリ及びコリネホルム細菌中で複製可能で、宿主にカナマイシン耐性能を付与する。また、クローニングサイトとしては、pHSG299由来のマルチクローニングサイトのうち、一ヶ所切断するクローニングサイトとしてP s t I、S a l I、B a m H I、K p n I、S a c I、E c o R Iを持つ。

#### 【0070】シャトルベクターpVC7の構築

pVK7と同様に、エシェリヒア・コリ用汎用ベクターであるpHSG399 (宝酒造社製) とpAM330を結合し、新規シャトルベクターpVC7を構築した。pAM330を制限酵素H i n d IIIにて一ヶ所切断し、切断面をT4DNAポリメラーゼにて平滑末端化した。また、pHSG399を制限酵素B s a Iにて一ヶ所切



断し同じくT4DNAポリメラーゼで平滑末端化した。得られた断片をライゲーションし、pAM330とpHSG399が連結したプラスミドを取得した。取得したプラスミドのうち、pVC7の構築の過程を図19に示す。pVC7はエシェリヒア・コリ及びコリネホルム細菌中で複製可能で、宿主にカナマイシン耐性能を付与する。また、クローニングサイトとしては、pHSG399由来のマルチプルクローニングサイトのうち、一ヶ所切断するクローニングサイトとしてPstI、SalI、BamHI、KpnI、SacI、EcoRI、SmaI、HindIIIを持つ。

#### 【0071】dapA、dapB、lysAを含有するプラスミドの作製

(1) lysAの取得及びそれを含有するプラスミドの作製

野生型のブレヴィバクテリウム・ラクトファーメンタムATCC13869株を染色体DNAの供与体として用いた。ATCC13869株より常法に従い、染色体DNAを調製した。染色体DNAよりPCRにより、argS、lysA及びこれらを含むオペロンのプロモーターを含むDNA断片を増幅した。増幅に用いたDNAプライマーとしては、コリネバクテリウム・グルタミカムにおいて既知となっている配列(Molecular Microbiology 4(11), 1819-1830(1990), Molecular and General Genetics 212, 112-119(1988)参照)を基にしてアルギニールtRNAシンターゼ及びDDCをコードする約3.6kbの領域を増幅すべく、配列表の配列番号13及び14に記載の塩基配列を有する各々23merの合成DNAを用いた。DNAの合成及びPCR反応は、常法に従って行った。すなわち、DNAの合成はApplied Biosystems社製DNA合成機model 380Bを使用し、ホスホアミタイト法を用いて(Tetrahedron Letters(1981), 22, 1859参照)常法に従って合成した。PCR反応は、宝酒造社製DNAサーマルサイクラーPJ2000型を用い、TaqDNAポリメラーゼを用い、供給者により指定された方法に従って遺伝子増幅を行なった。増幅されたDNAの配列を配列番号15に示す。増幅された3579bpの遺伝子断片のクローン化用のベクターにはpHSG399を用いた。pHSG399を制限酵素SmaIにて切断し、増幅されたlysAを含むDNA断片と連結した。この様にして取得したATCC13869由来のlysAを有するプラスミドをp399LYSAと命名した。更に、p399LYSAをKpnIとBamHIで切断することにより、lysAを含むDNA断片を得た。このDNA断片を、pHSG299をKpnIとBamHIで切断したものと連結した。得られたプラスミドをp299LYSAと命名した。p299LYSA構築の過程を図20に示す。p399LYSAをKpnIとBamHIで切断することによってlysA断片を得、この断片をKpnIとB

amHIにて切断したpVK7と連結した。この作製したプラスミドをpLYSAmと命名した(図21)。

【0072】(2) dapAの取得及びそれを含有するプラスミドの作製

ブレヴィバクテリウム・ラクトファーメンタム野生株ATCC13869株を染色体DNAの供与体として用いた。ATCC13869株より常法に従い、染色体DNAを調製した。染色体DNAよりPCRによりdapAを含むDNA断片を増幅した。増幅に用いたDNAプライマーはコリネバクテリウム・グルタミカムにおいて既知となっている配列(Nucleic Acids Research 18(21), 6421(1990)、EMBL accession No.X53993参照)を基にしてDDPSをコードする約1.5kbの領域を増幅すべく、配列表の配列番号16及び17に記載の塩基配列を有する各々23merのDNAを合成した。DNAの合成及びPCR反応は、常法に従って行った。増幅されたDNAの配列を配列番号18に示す。増幅された1411bpの遺伝子断片のクローン化用のベクターにはpCR1000(Invitrogen社製;Bio/Technology 9,657-663(1991)参照)を用い、増幅したdapA断片と連結した。DNAの連結は、DNAライゲーションキット(宝酒造社製)を用い、指定された方法にて行なった。この様にしてpCR1000にブレヴィバクテリウム・ラクトファーメンタム染色体より増幅されたdapA断片1411bpの挿入されたプラスミドを作製した。この様にして取得したATCC13869由来のdapAを有するプラスミドをpCRDAPAと命名した(図22)。エシェリヒア・コリにpCRDAPAを導入して得られた形質転換株AJ13106株は、平成7年5月26日付けで通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所(郵便番号305日本国茨城県つくば市東一丁目1番3号)にFERMBP-5113の受託番号で、ブダベスト条約に基づき国際寄託されている。dapAを有するプラスミドpCRDAPAをKpnIおよびEcoRIにて切断し、dapAを含むDNA断片を得、ベクタープラスミドpHSG399をKpnIおよびEcoRIにて切断したものと連結した。得られたプラスミドをp399DPSと命名した(図23)。

【0073】(3) 野生型及び変異型lysCの取得及びそれらを含有するプラスミドの作製

ブレヴィバクテリウム・ラクトファーメンタムATCC13869株、及びATCC13869株より変異処理により得られたL-リジン生産性変異株AJ3445を染色体DNAの供与体として用いた。AJ3445株は、変異によりlysCがリジン及びスレオニンによる協奏阻害が実質的に解除されている(Journal of Biochemistry 68,701-710(1970))。染色体DNAよりPCR法(polymerase chain reaction;White,T,J.et al;Trends Genet.5,185(1989)参照)によりlysCを含むDNA断片を増幅した。増幅に用いたDNAプライマーはコリ

ネバクテリウム・グルタミカムにおいて既知となっている配列 (Molecular Microbiology (1991) 5(5), 1197-1204, Mol. Gen. Genet. (1990) 224, 317-324参照) を基にして *lys C* をコードする約 1643 bp の領域を増幅すべく、配列番号 19 及び配列番号 20 に示す塩基配列を有する 23mer 及び 21mer の一本鎖 DNA を合成した。DNA の合成は常法に従って合成した。PCR 反応は常法に従って遺伝子増幅を行なった。増幅された DNA の配列を配列番号 21 に示す。増幅された 1643 bp の遺伝子断片をアガロースゲル電気泳動により確認した後、ゲルより切り出した断片を常法により精製し、制限酵素 *Nru I* 及び *EcoRI* にて切断した。遺伝子断片のクローン化用ベクターには *pHSG399* を用いた。*pHSG399* を制限酵素 *Sma I* 及び制限酵素 *EcoRI* にて切断し、増幅された *lys C* 断片と連結した。DNA の連結は DNA ライゲーションキット (宝酒造社製) を用い、指定された方法にて行なった。この様にして *pHSG399* にプレバクテリウム・ラクトファーマンタム染色体より増幅された *lys C* 断片が連結されたプラスミドを作製した。野生株である ATCC 13869 株由来の *lys C* を有するプラスミドを *p399AKY*、*L*-リジン生産菌である AJ3445 由来の *lys C* を有するプラスミドを *p399AK9* と命名した (図 24)。

#### 【0074】 (4) *dapB* の取得及びそれを含有するプラスミドの作製

プレバクテリウム・ラクトファーマンタム野生株 ATCC 13869 株を染色体 DNA の供与体として用いた。ATCC 13869 株より常法に従い、染色体 DNA を調製した。染色体 DNA より PCR により *dapB* を含む DNA 断片を増幅した。増幅に用いた DNA プライマーはプレバクテリウム・ラクトファ 2743-2749 (1993) 参照) を基にして *DDPR* をコードする約 2.0 kb の領域を増幅すべく、配列表の配列番号 22 及び 23 に記載の塩基配列を有する各々 23mer の DNA 断片を合成した。DNA の合成及び PCR 反応は、常法に従って行った。増幅された DNA の配列を配列番号 24 に示す。増幅された 2001 bp の遺伝子断片のクローン化用ベクターには *pCR-Script* (*Invitrogen* 社製) を用い、増幅した *dapB* 断片と連結した。この様にして *pCR-Script* にプレバクテリウム・ラクトファーマンタム染色体より増幅された *dapB* 断片 2001 bp の挿入されたプラスミドを作製した。この様にして取得した ATCC 13869 由来の *dapB* を有するプラスミドを *pCRDAPB* と命名した (図 25)。エシェリヒアコリに *pCRDAPB* を導入して得られた形質転換株 AJ13107 株は、平成 7 年 5 月 26 日付けで通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (郵便番号 305 日本国茨城県つくば市東一丁目 1 番 3 号) に FERM BP-5114 の受託番号

で、ブダペスト条約に基づき国際寄託されている。

#### 【0075】 (5) *lys C*、*dapA* 及び *dapB* を含有するプラスミドの作製

*p399DPS* を *EcoRI*、*SphI* にて切断し、平滑末端化した後、*dapA* 遺伝子断片を得た。この断片を、*p399AK9* を *SalI* にて切断し平滑末端化したものとライゲーションし、変異型 *lys C* と *dapA* が共存したプラスミド *p399CA* を構築した。*dapB* を有するプラスミド *pCRDAPB* を *EcoRI* にて切断、平滑末端化した後、*SacI* にて切断し、*dapB* を含む 2.0 kb の DNA 断片を得た。*dapA* 及び変異型 *lys C* を有するプラスミド *p399CA* を *SpeI* にて切断、平滑末端化した後、*SacI* にて切断し、先に得た 2.0 kb の *dapB* 断片とライゲーションし、変異型 *lys C*、*dapA* 及び *dapB* を含むプラスミドを得た。このプラスミドを *p399CAB* と命名した (図 26)。次に *p399CAB* を *SacI* にて切断し、平滑末端化した後、*dapA* と *dapB* 断片を得た。この断片を *pLYSA* を *BamHI* にて切断し平滑末端化したものと連結した。この様にしてコリネ型細菌中で自律増殖可能でかつ *dapA*、*dapB*、*lysA* を含むプラスミドを作製した。作製したプラスミドを *pABLm* と命名した。*pABLm* 構築の過程を図 21 に示す。

#### 【0076】 *dapA*、*dapB*、*lysA* を含むプラスミドのプレバクテリウム・ラクトファーマンタム Tn7156-Cint-Y2 への導入

作製された *dapA*、*dapB*、*lysA* を含むプラスミド *pABLm* をプレバクテリウム・ラクトファーマンタム Tn7156-Cint-Y2 に導入した。プラスミド導入の方法は、電気パルス法 (杉本ら、特開平 2-207791 号公報) によった。形質転換体の選択は、プラスミドが持つ薬剤耐性マーカー、カナマイシン耐性遺伝子と染色体上に増幅されているテトラサイクリン耐性遺伝子によった。よって、25 µg/ml のカナマイシン (Km) と 1.5 µg/ml のテトラサイクリン (Tc) を含む完全培地にて形質転換体の選択を行った。形質転換体を Tn7156-Cint-Y2/*pABLm* と命名した。

#### 【0077】 *lys C*、*dapA*、*dapB*、*lysA* を含むプラスミドのプレバクテリウム・ラクトファーマンタム野生型株への導入

(1) *p399CAB* に *Brevi. -ori* を導入した。*Brevi. -ori* を有するプラスミド *pHK4* を制限酵素 *BamHI* にて切断し、切断面を平滑末端化した。平滑末端化は DNA Blunting kit (宝酒造社製) を用い、指定された方法にて行なった。平滑末端化後、リン酸化済み *KpnI* リンカー (宝酒造社製) を連結し、*pHK4* より *Brevi. -ori* 部分の DNA 断片を *KpnI* のみによる切断によって切り

出される様改変した。このプラスミドをKpnIにより切断し、生じたBrevi. -ori DNA断片を同じくKpnIにて切断したp399CABに連結し、コリネ型細菌中で自律増殖可能でかつ変異型lysC、dapAおよびdapBを併せ持つプラスミドを作製し、pCABと命名した。pCABの構築の過程を図26に示す。pHK4は、pHC4をKpnI及びBamHIで切断し、Brevi. -ori断片を抽出し、同じくKpnI及びBamHIにて切断したpHSG298に連結することによって構築される(特開平5-7491号公報参照)。pHK4は、宿主にカナマイシン耐性を付与する。尚、pHK4を保持するエシェリヒア・コリAJ13136は、平成7年8月1日に、通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所(郵便番号305日本国茨城県つくば市東一丁目1番3号)に受託番号FERMBP-5186としてブタペスト条約に基づき寄託されている。

【0078】(2) lysAを有するプラスミドp299LYSAをKpnI及びBamHIにて切断し、平滑末端化した後、lysA遺伝子断片を得た。この断片を、pCABをHpaIにて切断したものとライゲーションし、コリネ型細菌中で自律増殖可能でかつ変異型lysC、dapA、dapB、及びlysAを併せ持つプラスミドを作製し、pCABLと命名した。pCABL構築の過程を図27に示す。尚、pCAEL中で、lysA遺伝子断片はdapB遺伝子を含むDNA断片内のHpaI部位に挿入されているが、このHpaI部位は、dapB遺伝子のプロモーターよりも上流(配列番号24中塩基番号611~616)に位置しており、dapB遺伝子は分断されていない。作製されたlysC、dapA、dapB、lysAを含むプラスミドpCABLをブレヴィバクテリウム・ラクトファーメンタム野生株AJ12036に導入し、5μg/mlのクロラムフェニコール(Cm)を含む完全培地にて形質転換体の選

択を行った。形質転換体をAJ12036/pCABLと命名した。

#### 【0079】構築した菌株の培養評価

ブレヴィバクテリウム・ラクトファーメンタム野生株AJ12036形質転換体AJ12036/pCABL及びTn7156-Cint-Y2/pABLmをL-リジン生産培地にて培養し、そのL-リジン生産能を評価した。L-リジン生産培地の組成は以下に示す通りである。

(L-リジン生産培地) 炭酸カルシウム以外の下記成分(1L中)を溶解し、KOHでpH8.0に調製し、115℃で15分殺菌した後、別に乾熱殺菌した炭酸カルシウムを50g加える。

グルコース	100g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	55g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1g
MgSO <sub>4</sub> ・7H <sub>2</sub> O	1g
ビオチン	500μg
チアミン	2000μg
FeSO <sub>4</sub> ・7H <sub>2</sub> O	0.01g
MnSO <sub>4</sub> ・7H <sub>2</sub> O	0.01g
ニコチンアミド	5mg
タンパク質加水分解物(豆濃)	30ml
炭酸カルシウム	50g

上記組成の培地に親株及び形質転換体を植菌し、31.5℃にて往復振盪培養を行った。培養72時間後のL-リジン生成量、生育( $O_{D562}$ )、培養終了時における安定性を表5に示す。生育は101倍希釈した後、562nmにてODを測定することにより定量した。また、安定性については、培養終了時における培養液を希釈後完全培地上にて生育させ、生育したコロニーを薬剤を含むプレート上での生育の割合で示した。

#### 【0080】

##### 【表5】

菌株/プラスミド	生育	L-リジン生産量(g/l)	安定性(%)
AJ12036	0.700	0.0	—
AJ12036/pCABL	0.590	28.1	90
Tn7156-Cint-Y2/pABLm	0.608	28.5	100

【0081】以上に示す様に、染色体上においてlysCを増強させた株を用いても、プラスミド上にてlysCを増強した場合と同様、リジン生産性は向上した。また、安定性はAJ12036/pCABLが90%であるのに対し、Tn7156-Cint-Y2/pABLmは100%であった。

#### 【0082】[実施例6]

##### pHTN7150の構築

カナマイシン耐性遺伝子が搭載された人工トランスポゾンTn7145にはジヒドロジピコリン酸シンターゼを

コードする遺伝子を挿入する良いサイトがないため、新たに挿入部位が導入されたpHTN7150を以下のようにして構築した。プラスミドベクターpUC4K(ファルマシアバイオテック社製)から制限酵素PstIを用いてカナマイシン耐性遺伝子を切り出し、それを平滑末端化した後にpHY300PLK(宝酒造社製)のSmaIサイトにクローニングし、pHY300-KMを構築した。次に、pHY300-KMより制限酵素EcoRIとXbaIを用いてカナマイシン耐性遺伝子を含む断片を切り出して平滑末端化し、この断片を先に構築し



菌株/プラスミド	生育	L-リジン生産量 (g/l)	安定性 (%)
AJ12036	0.700	0.0	—
AJ12036/pCABL	0.590	28.1	90
AJ12036::A/pCBLmc	0.595	28.7	100

【0088】以上に示す様に、染色体上においてdapAを増強させた株を用いても、プラスミド上にlysCを増強した場合と同様、リジン生産性は向上した。また、安定性はAJ12036/pCABLが90%であるのに対し、AJ12036::A/pCBLmcは100%であった。

#### 【0089】[実施例7]

トランスポゾンユニット内にトランスポゼースを含まない人工トランスポゾンの構築

【0090】大腸菌由来Trcプロモーター等によるトランスポゼース発現プラスミド構築

5'-CCGGACAGCTCACCACAAAATCAATGCACCTCTAAAAAGGTACCT - 3' 配列番号25  
3'-TGTCGAGTGGGTGTTTACGTTACGTGAGATTTTCCATGGAGATC- 5' 配列番号26

このことにより、TnpL/pUC19上のトランスポゼース3'側に存在していたIRを除去したプラスミドORFL/pUC19を構築した。次にこのORFL/pUC19を制限酵素SmaIとXbaIで切断し、トランスポゼースを含む約1.5kbの遺伝子断片を取得した。このトランスポゼース遺伝子断片をプラスミドベクターpHY300PLK(宝酒造社製)のSmaIからXbaIの間を除去したところに挿入した後に、制限酵素EcoRIとKpnIで切り出した。このEcoRI-KpnIのトランスポゼース遺伝子断片をT4DNAポリメラーゼで平滑末端化したものを、プラスミドベクターpHSG398(宝酒造社製)を制限酵素PvuIIによって部分分解し、マルチクローニングサイトを含む約0.3kbの断片を除いたところにライゲーションし、プラスミドpORF1を構築した(図10)。

【0091】一方、先に取得したプラスミドpHIS714のNheI-XbaI切断断片を平滑末端化し、プラスミドベクターpUC19のPstIサイトを平滑末端化したところに導入したプラスミドTnp(Pst)/pUC19を構築した。このTnp(Pst)/pUC19上で、トランスポゼース遺伝子中の一部の塩基置換をU. S. E. Mutagenesis kit(ファルマシア バイオテック社製)を用いて行った。置換した塩基はIS714の配列上では288番目の塩基にあたるGであり、これをCに変更した。これはGTGのGTCへの変更であり、アミノ酸レベルでの変化ではない。塩基置換の行われたプラスミドはTnp(Pst)M/pUC19と命名した。pORF1上でトランスポゼース前半部分遺伝子中に存在する制限酵素サイトSmaIとNaeIの間を除去したところに、Tnp(Pst)M/pUC19を制限酵素SmaIとNaeI

プラスミドpHIS714を制限酵素NheI及びXbaIによって切断し、IS714の5'側インバーテッドリピート(IR)を除いたトランスポゼースをコードする遺伝子を含む断片を取得し、このDNA断片をプラスミドベクターpUC19のXbaIサイトに導入したプラスミドTnpL/pUC19を構築した。さらにTnpL/pUC19を制限酵素MroIとXbaIで切断することによって、IS714の終止コドンと3'側インバーテッドリピート(IR)を含む配列を除去し、そこに以下に示す配列の合成二本鎖DNAをライゲーションし、挿入した。

Iで切断することによって得られるトランスポゼース前半部分遺伝子断片(GTG→GTCの変異が含まれる)をライゲーションし、pORF2を構築した。pORF2のSmaIサイトからXbaIサイトの間を除去して平滑末端化したところに、pBSF2-SD7から制限酵素NaeIとHindIIIを用いて切り出したトリプトファンオペロンアテニューエーターを含むDNA断片を、平滑末端化した後に挿入した。ここで構築したプラスミドをpORF3と命名した。プラスミドpBSF2-SD7(WO92/14832)はエシェリヒア・コリHB101に導入されて、得られた形質転換体はエシェリヒア・コリAJ12448と命名された。同株は、平成元年6月1日付で通産省工業技術院生命工学工業技術研究所(郵便番号305日本国茨城県つくば市東一丁目1番3号)に寄託され受託番号FERM P-10758が付与された。また、平成4年2月19日付でブタベスト条約に基づく国際寄託に移管され受託番号FERM BP-3753が付与されている。

【0092】pORF3を制限酵素SalIとBpu1102Iで切断してトランスポゼース前半部分遺伝子断片を除いたところにTnp(Pst)/pUC19を制限酵素SalIとBpu1102Iで切断して得られたトランスポゼース前半部分遺伝子断片をライゲーションし、pORF4を構築した(図11)。また、TnpL/pUC19をSacIで切断した後に、BAL31ヌクレアーゼで30℃、20分間分解し、トランスポゼース遺伝子の開始コドン近傍を上流側から削除する。その後、削除を行った末端を平滑末端化した後に、トランスポゼース遺伝子断片をSphIサイトを利用して切り出し、pHSG398をSmaIとSphIで切断したところに挿入した。このようにして構築できたプラスミド

を  $\text{delTnp5}/398$  と命名した。  $\text{delTnp5}/398$  を制限酵素  $\text{KpnI}$  と  $\text{HindIII}$  で切断して取得したトランスポゼース前半部分遺伝子断片を平滑末端化した後に、プラスミドベクター  $\text{pKK233-2}$  (ファルマシア パイオテック社製) を  $\text{NcoI}$  と  $\text{HindIII}$  で切断して平滑末端化したところにライゲーションし、  $\text{pTrc-ORF}$  を構築した。  $\text{pTrc-ORF}$  を  $\text{SspI}$  と  $\text{Bpu1102I}$  で切断することによって得られる  $\text{Trc}$  プロモーターとトランスポゼース前半部分遺伝子を含む断片を、  $\text{pORF3}$  を  $\text{XbaI}$  で切断して平滑末端化した後に、更に  $\text{Bpu1102I}$  で切断してそのトランスポゼース前半部分遺伝子断片を除去したところに挿入して、  $\text{pORF7}$  を構築した (図12)。

【0093】また、  $\text{delTnp5}/398$  を制限酵素  $\text{KpnI}$  と  $\text{HindIII}$  で切断して取得したトランスポゼース前半部分遺伝子断片を、プラスミドベクター  $\text{pUC18}$  の  $\text{KpnI}$  と  $\text{HindIII}$  の間にクローニングした。そのプラスミドの  $\text{BsmI}$  と  $\text{NaeI}$  の間を除去して、これと  $\text{Tnp (Pst) M/pUC19}$  を制限酵素  $\text{BsmI}$  と  $\text{NaeI}$  で切断することによって得られるト

5' - CTAGCTCGAGATATCAGATCTACTAGTCGACCGC - 3' 配列番号27  
3' - GAGCTCTATAGTCTAGATGATCAGCTGG - 5' 配列番号28

$\text{pHTN7160}$  を制限酵素  $\text{KpnI}$  で切断し平滑末端化した後に、更に  $\text{BglI}$  で切断することによって  $\text{IS714}$  の両側のインバーテッドリピート (IR) とコリネ型細菌内で機能する温度感受性複製起点を含む断片を取得した。また、  $\text{pORF3}$  を制限酵素  $\text{EarI}$  で切断し平滑末端化した後に、更に  $\text{BglI}$  で切断する。そこに上記  $\text{pHTN7160}$  由来断片を挿入し、  $\text{pORF41-pre}$  を構築した。次に、  $\text{pORF41-pre}$  を  $\text{EcoRI}$  で切断したところに、  $\text{pBR322}$  由来の  $\text{Tc}$  耐性遺伝子を含む  $\text{EcoRI-AvaI}$  の平滑末端化断片を挿入し、  $\text{pORF41}$  を構築した (図14)。同様の方法を繰り返して、  $\text{pORF4}$  からは  $\text{pORF31-pre}$  を経由して  $\text{pORF31}$  を、  $\text{pORF7}$  からは  $\text{pORF71-pre}$  を経由して  $\text{pORF71}$  を、  $\text{pORF8}$  からは  $\text{pORF81-pre}$  を経由して  $\text{pORF81}$  を構築した。プラスミド  $\text{pORF81}$  はエシェリヒア・コリ  $\text{AJ13208}$  に保持されている。同株は、平成8年6月3日付で通産省工業技術院生命工学工業技術研究所 (郵便番号305日本国茨城県つくば市東一丁目1番3号) にブタベスト条約に基づいて国際寄託され、受託番号  $\text{FERM BP-5557}$  が付与されている。

【0095】また、  $\text{pORF3}$  を  $\text{XbaI}$  と  $\text{EarI}$  で切断した後に平滑末端化し、セルフライゲーションさせ、トランスポゼース遺伝子を含まない  $\text{pORFC0}$  を構築した (図15)。  $\text{pORF3}$  より  $\text{pORF41}$  を構築したときと同様の方法で  $\text{pORFC0}$  より  $\text{pORFC2-pre}$  を経由してトランスポゾンユニット (トランスポゼース遺伝子を含まない) のみからなる  $\text{pORFC}$

ランスポゼース前半部分遺伝子断片 ( $\text{G}\rightarrow\text{C}$  への置換型) とをライゲーションし、  $\text{delTnp5M}/18$  を構築した。  $\text{delTnp5M}/18$  を  $\text{KpnI}$  と  $\text{HindIII}$  で切断することによって得られたトランスポゼース前半部分遺伝子断片を平滑末端化したものを、  $\text{pKK233-2}$  を  $\text{NcoI}$  と  $\text{HindIII}$  で切断して平滑末端化したところにライゲーションし、  $\text{pTrc-TnpM}$  を構築した。  $\text{pTrc-Tnp}$  より  $\text{pORF7}$  を構築した方法と同様の方法を用いて、  $\text{pTrc-TnpM}$  と  $\text{pORF3}$  より  $\text{pORF8}$  を構築した (図13)。

【0094】人工トランスポゾンユニットとユニット外にトランスポゼース発現系を搭載したコリネ型細菌導入用プラスミドの構築

前項のプラスミド  $\text{pORF3}$ 、  $\text{pORF4}$ 、  $\text{pORF7}$ 、  $\text{pORF8}$  を材料に各プラスミドの構築を行った。以下に  $\text{pORF3}$  から  $\text{pORF41}$  を構築する手順を示す。まず、  $\text{pHIS714}$  を  $\text{NheI}$  と  $\text{SacII}$  で切断し、トランスポゼース遺伝子の大部分を除去したところに、以下の配列の二本鎖合成DNAを挿入し、  $\text{pHTN7160}$  を構築した。

2 を構築した。これらの最終的に構築されたプラスミド上にはトランスポゼースの構造遺伝子、  $\text{Cm}$  耐性遺伝子、大腸菌内で機能する複製起点、コリネ型細菌内で機能する温度感受性複製起点、及び  $\text{IS714}$  由来の IR に挟まれた  $\text{Tc}$  耐性遺伝子が存在する。ただし、  $\text{pORFC2}$  に関してはトランスポゼースの構造遺伝子は存在しない。  $\text{IS714}$  の両端の IR と  $\text{Tc}$  耐性遺伝子のユニットをトランスポゾンユニット  $\text{Tn7162}$  と命名した。

【0096】トランスポゾンユニットの転移によって生じる染色体上の  $\text{Tc}$  耐性遺伝子を有するトランスポゾンユニットのコピー数の評価

構築したプラスミドの内、  $\text{pORF31}$ 、  $\text{pORF41}$ 、  $\text{pORF81}$ 、  $\text{pORFC2}$  を用いて転移実験を行った。転移すると考えられるユニットはトランスポゾンユニット  $\text{Tn7162}$  である。上記プラスミドを用いて、ブレヴィバクテリウム・ラクトフェルメンタム  $\text{AJ12036}$  を形質転換し、トランスポゾンユニット  $\text{Tn7162}$  の宿主染色体への転移によって生じる染色体上の  $\text{Tn7162}$  のコピー数を評価した。その方法は形質転換体を  $\text{Cm } 5 \mu\text{g/ml}$  を含む上記  $\text{CM2G}$  液体培地中に、  $25^\circ\text{C}$  で一晚培養後、  $0.9\% \text{NaCl}$  液で適宜希釈して  $\text{Tc}$  を  $1.5 \mu\text{g/ml}$  から  $4 \mu\text{g/ml}$  の範囲で含む上記  $\text{CM2G}$  寒天培地に  $100 \mu\text{l}$  ずつ塗布した。それらを  $34^\circ\text{C}$  で培養し、出現したコロニーの中から  $\text{Cm}$  感受性のクローンを選んだ。それらを  $34^\circ\text{C}$  で培養し、出現したコロニーの中からランダムに数クローンを選び、染色体DNAを調製し、制限酵素  $\text{PvuII}$

で完全に消化し、アガロースゲル電気泳動を行い、ニトロセルロース（あるいはナイロン、P V D F）フィルターにブロッティングした。このフィルターを<sup>32</sup>PラベルあるいはE C Lダイレクトラベリングシステム（アマシャム社製）にてラベルしたT c耐性遺伝子断片をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションし、プローブとハイブリダイズするバンドの数を検定した。その結果、表7に示したように、T c耐性マーカー遺伝子をもつトランスポゾンユニットT n 7 1 6 2は、ある頻

度で高コピー転移していることが検出された。この結果は発現型トランスポゼース遺伝子がプラスミド上のトランスポゾンユニット外に存在（p O R F 3 1, 4 1, 8 1の場合）しても、あるいは染色体上に本来存在するトランスポゼース（p O R F C 2の場合）によっても機能していることを示している。

【0097】

【表7】

プラスミド名	選択 T c 濃度 (μ g / m l)	T c 耐性遺伝子コピー数
p O R F C 2	1. 5	> 8
	2. 0	> 1 2
p O R F 3 1	2. 0	> 7
p O R F 4 1	1. 5	> 1 1
p O R F 8 1	1. 5	3
		4
		1 0
		1 1
	2. 0	3
		4
		4
	4. 0	5

【0098】【実施例8】

トランスポゼース発現系のみを搭載したコリネ型細菌用プラスミドの構築と染色体上のトランスポゾンユニットの転移

【0099】トランスポゼース発現系のみを搭載したコリネ型細菌用プラスミドの構築

プラスミドp H I S 7 1 4 K 1をE c o O 1 0 9 IとM r o Iで切断することによって、I S 7 1 4を除去した後、セルフライゲーションを行い、p H I S 7 1 4 K d e lを構築した。一方、p O R F 3を制限酵素E a r Iで切断し平滑末端化した後に、更にB g l Iで切断した。そこにp H I S 7 1 4 K d e lを制限酵素K p n Iで切断し平滑末端化した後に、更にB g l Iで切断することによって得られたコリネ型細菌内で機能する温度感受性複製起点を含む断片をライゲーションして、p O R F 4 0を構築した（図17）。同様の方法を利用して、p O R F 4からはp O R F 3 0を、p O R F 7からはp O R F 7 0を、p O R F 8からはp O R F 8 0を、p O R F C 0からはp O R F C 1を構築した。

【0100】トランスポゾンユニットの転移によって生じる染色体上のT c耐性遺伝子を有するトランスポゾンユニットのコピー数の評価

構築したプラスミドの内、p O R F 8 0、p O R F C 1を用いて転移実験を行った。転移すると考えられるユニットはトランスポゾンユニットT n 7 1 6 2である。実施例7にプレバクテリウム・ラクトフェルメンタムA

J I 2 0 3 6をトランスポゾンユニットT n 7 1 6 2を搭載するプラスミドで形質転換して、トランスポゾンユニットT n 7 1 6 2が宿主染色体へ多コピー転移することを示した。ここで得られた1コピー染色体転移株を宿主として、さらに上記プラスミドp O R F 8 0及びp O R F C 1を導入してトランスポゼース活性を高めた場合に、染色体上のT n 7 1 6 2がさらに転移あるいは複製するかを、染色体DNAのサザンハイブリダイゼーション解析を行って、そのコピー数を評価した。その方法は形質転換体をC m 5 μ g / m lを含む上記C M 2 G液体培地中に、25℃で一晩培養後、0.9% N a C l液で適宜希釈してT cを6 μ g / m lから20 μ g / m lの範囲で含む上記C M 2 G寒天培地に100 μ lずつ塗布した。それらを34℃で培養し、出現したコロニーの中からC m感受性のクローンを選んだ。これらのC m感受性のクローンの中からランダムに数クローンを選び、染色体DNAを調製し、制限酵素P v u IIで完全に消化し、アガロースゲル電気泳動を行い、ニトロセルロース（あるいはナイロン、P V D F）フィルターにブロッティングした。このフィルターを<sup>32</sup>PラベルあるいはE C Lダイレクトラベリングシステム（アマシャム社製）にてラベルしたT c耐性遺伝子断片をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションし、プローブとハイブリダイズするバンドの数を検定した。その結果、T c耐性マーカー遺伝子をもつトランスポゾンユニットT n 7 1 6 2は、ある頻度で多コピー転移、複製していること

が見出された。

【0101】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：1453 base pairs

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

起源

生物名：ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム (Brevibacterium lactofermentum)

株名：AJ12036

配列の特徴

特徴を表す記号：insertion seq

存在位置：1..1453

特徴を決定した方法：E

配列の特徴

特徴を表す記号：

存在位置：130..1440

特徴を決定した方法：S

配列の特徴

特徴を表す記号：repeat region

存在位置：1..15

特徴を決定した方法：S

配列の特徴

特徴を表す記号：repeat region

存在位置：1339..1453

特徴を決定した方法：S

配列の特徴

特徴を表す記号：-35 region

存在位置：71..76

特徴を決定した方法：S

配列の特徴

特徴を表す記号：-10 region

存在位置：92..97

特徴を決定した方法：S

配列

GGCCCTTCGG	GTTTGGGGT	ACATCACAGA	ACCTGGGCTA	GCGGTGTAGA	CCCGAAAATA	60
AACGAGCCTT	TTGTCAGGGT	TAAGGTTTAG	GTATCTAAGC	TAACCAAACA	CCAACAAAAG	120
GCTCTAACC	ATG AAG TCT ACC GGC AAC ATC ATC GCT GAC ACC ATC TGC					168
	Met Lys Ser Thr Gly Asn Ile Ile Ala Asp Thr Ile Cys					
	1 5 10					
CGC ACT GCG GAA CTA GGA CTC ACC ATC ACC GGC GCT TCC GAT GCA GGT						216
Arg Thr Ala Glu Leu Gly Leu Thr Ile Thr Gly Ala Ser Asp Ala Gly						
	15 20 25					
GAT TAC ACC CTG ATC GAA GCA GAC GCA CTC GAC TAT ACC TCC ACC TGC						264
Asp Tyr Thr Leu Ile Glu Ala Asp Ala Leu Asp Tyr Thr Ser Thr Cys						
	30 35 40 45					
CCA GAA TGC TTC CAA CCT GGG GTG TTT CGT CAT CAC ACC CAC CGG ATG						312
Pro Glu Cys Phe Gln Pro Gly Val Phe Arg His His Thr His Arg Met						
	50 55 60					
CTC ATT GAT TTA CCC ATC GTC GGG TTT CCC ACC AAA CTG TTT ATC CGT						360
Leu Ile Asp Leu Pro Ile Val Gly Phe Pro Thr Lys Leu Phe Ile Arg						
	65 70 75					
CTA CCT CGC TAC CGC TGC ACC AAC CCG ACA TGT AAG CAA AAG TAT TTC						408
Leu Pro Arg Tyr Arg Cys Thr Asn Pro Thr Cys Lys Gln Lys Tyr Phe						
	80 85 90					
CAA GCA GAA CTA AGC TGC GCT GAC CAC GGT AAA AAG GTC ACC CAC CGG						456
Gln Ala Glu Leu Ser Cys Ala Asp His Gly Lys Lys Val Thr His Arg						
	95 100 105					
GTC ACC CGC TGG ATT TTG CAA CGC CTT GCT ATT GAC CGG ATG AGT GTT						504
Val Thr Arg Trp Ile Leu Gln Arg Leu Ala Ile Asp Arg Met Ser Val						
	110 115 120 125					
CAC GCA ACT GCG AAA GCA CTT GGG CTA GGG TGG GAT TTA ACC TGC CAA						552
His Ala Thr Ala Lys Ala Leu Gly Leu Gly Trp Asp Leu Thr Cys Gln						
	130 135 140					
CTA GCC CTC GAT ATG TGC CGT GAG CTG GTC TAT AAC GAT CCT CAC CAT						600



Leu Ala Leu Asp Met Cys Arg Glu Leu Val Tyr Asn Asp Pro His His	
145 150 155	
CTT GAT GGA GTG TAT GTC ATT GGG GTG GAT GAG CAT AAG TGG TCA CAT	648
Leu Asp Gly Val Tyr Val Ile Gly Val Asp Glu His Lys Trp Ser His	
160 165 170	
AAT AGG GCT AAG CAT GGT GAT GGG TTT GTC ACC GTG ATT GTC GAT ATG	696
Asn Arg Ala Lys His Gly Asp Gly Phe Val Thr Val Ile Val Asp Met	
175 180 185	
ACC GGG CAT CGG TAT GAC TCA CGG TGT CCT GCC CGG TTA TTA GAT GTC	744
Thr Gly His Arg Tyr Asp Ser Arg Cys Pro Ala Arg Leu Leu Asp Val	
190 195 200 205	
GTC CCA GGT CGT AGT GCT GAT GCT TTA CGG TCC TGG CTT GGC TCC CGC	792
Val Pro Gly Arg Ser Ala Asp Ala Leu Arg Ser Trp Leu Gly Ser Arg	
210 215 220	
GGT GAA CAG TTC CGC AAT CAG ATA CGG ATC GTG TCC ATG GAT GGA TTC	840
Gly Glu Gln Phe Arg Asn Gln Ile Arg Ile Val Ser Met Asp Gly Phe	
225 230 235	
CAA GGC TAC GCC ACA GCA AGT AAA GAA CTC ATT CCT TCT GCT CGT CGC	888
Gln Gly Tyr Ala Thr Ala Ser Lys Glu Leu Ile Pro Ser Ala Arg Arg	
240 245 250	
GTG ATG GAT CCA TTC CAT GTT GTG CGG CTT GCT GGT GAC AAG CTC ACC	936
Val Met Asp Pro Phe His Val Val Arg Leu Ala Gly Asp Lys Leu Thr	
255 260 265	
GCC TGC CGG CAA CGC CTC CAG CGG GAG AAA TAC CAG CGT CGT GGT TTA	984
Ala Cys Arg Gln Arg Leu Gln Arg Glu Lys Tyr Gln Arg Arg Gly Leu	
270 275 280 285	
AGC CAG GAT CCG TTG TAT AAA AAC CGG AAG ACC TTG TTG ACC ACG CAC	1032
Ser Gln Asp Pro Leu Tyr Lys Asn Arg Lys Thr Leu Leu Thr Thr His	
290 295 300	
AAG TGG TTG AGT CCT CGT CAG CAA GAA AGC TTG GAG CAG TTG TGG GCG	1080
Lys Trp Leu Ser Pro Arg Gln Gln Glu Ser Leu Glu Gln Leu Trp Ala	
305 310 315	
TAT GAC AAA GAC TAC GGG GTG TTA AAG CTT GCG TGG CTT GCG TAT CAG	1128
Tyr Asp Lys Asp Tyr Gly Val Leu Lys Leu Ala Trp Leu Ala Tyr Gln	
320 325 330	
GCG ATT ATT GAT TGT TAT CAG ATG GGT AAT AAG CGT GAA GCG AAG AAG	1176
Ala Ile Ile Asp Cys Tyr Gln Met Gly Asn Lys Arg Glu Ala Lys Lys	
335 340 345	
AAA ATG CGG ACC ATT ATT GAT CAG CTT CGG GTG TTG AAG GGG CCG AAT	1224
Lys Met Arg Thr Ile Ile Asp Gln Leu Arg Val Leu Lys Gly Pro Asn	
350 355 360 365	
AAG GAA CTC GCG CAG TTG GGT CGT AGT TTG TTT AAA CGA CTT GGT GAT	1272
Lys Glu Leu Ala Gln Leu Gly Arg Ser Leu Phe Lys Arg Leu Gly Asp	
370 375 380	
GTG TTG GCG TAT TTC GAC GTA GGA GTC TCC AAC GGA CCA GTC GAA GCC	1320
Val Leu Ala Tyr Phe Asp Val Gly Val Ser Asn Gly Pro Val Glu Ala	
385 390 395	
ATC AAT GGA CGC CTA GAA CAC CTC CGC GGA ATC GCG CTT GGA TTC CGC	1368
Ile Asn Gly Arg Leu Glu His Leu Arg Gly Ile Ala Leu Gly Phe Arg	
400 405 410	

AAC CTC ACC CAC TAC ATC CTT CGA TGC CTC ATC CAC TCC GGA CAG CTC 1416  
 Asn Leu Thr His Tyr Ile Leu Arg Cys Leu Ile His Ser Gly Gln Leu  
 415 420 425  
 ACC CAC AAA ATC AAT GCA CTC TAA AAACGGAAGA GCC 1453  
 Thr His Lys Ile Asn Ala Leu  
 430 435

【0102】配列番号：2  
 配列の長さ：436 amino acids  
 配列の型：アミノ酸  
 鎖の数：一本鎖  
 トポロジー：直鎖状

配列の種類：蛋白質  
 起源  
 生物名：ブレビバクテリウム・ラクトファermenタム (Brevibacteriu  
 m lactofermentum)  
 株名：AJ12036

配列

Met Lys Ser Thr Gly Asn Ile Ile Ala Asp Thr Ile Cys Arg Thr Ala  
 1 5 10 15  
 Glu Leu Gly Leu Thr Ile Thr Gly Ala Ser Asp Ala Gly Asp Tyr Thr  
 20 25 30  
 Leu Ile Glu Ala Asp Ala Leu Asp Tyr Thr Ser Thr Cys Pro Glu Cys  
 35 40 45  
 Phe Gln Pro Gly Val Phe Arg His His Thr His Arg Met Leu Ile Asp  
 50 55 60  
 Leu Pro Ile Val Gly Phe Pro Thr Lys Leu Phe Ile Arg Leu Pro Arg  
 65 70 75 80  
 Tyr Arg Cys Thr Asn Pro Thr Cys Lys Gln Lys Tyr Phe Gln Ala Glu  
 85 90 95  
 Leu Ser Cys Ala Asp His Gly Lys Lys Val Thr His Arg Val Thr Arg  
 100 105 110  
 Trp Ile Leu Gln Arg Leu Ala Ile Asp Arg Met Ser Val His Ala Thr  
 115 120 125  
 Ala Lys Ala Leu Gly Leu Gly Trp Asp Leu Thr Cys Gln Leu Ala Leu  
 130 135 140  
 Asp Met Cys Arg Glu Leu Val Tyr Asn Asp Pro His His Leu Asp Gly  
 145 150 155 160  
 Val Tyr Val Ile Gly Val Asp Glu His Lys Trp Ser His Asn Arg Ala  
 165 170 175  
 Lys His Gly Asp Gly Phe Val Thr Val Ile Val Asp Met Thr Gly His  
 180 185 190  
 Arg Tyr Asp Ser Arg Cys Pro Ala Arg Leu Leu Asp Val Val Pro Gly  
 195 200 205  
 Arg Ser Ala Asp Ala Leu Arg Ser Trp Leu Gly Ser Arg Gly Glu Gln  
 210 215 220  
 Phe Arg Asn Gln Ile Arg Ile Val Ser Met Asp Gly Phe Gln Gly Tyr  
 225 230 235 240  
 Ala Thr Ala Ser Lys Glu Leu Ile Pro Ser Ala Arg Arg Val Met Asp  
 245 250 255  
 Pro Phe His Val Val Arg Leu Ala Gly Asp Lys Leu Thr Ala Cys Arg  
 260 265 270  
 Gln Arg Leu Gln Arg Glu Lys Tyr Gln Arg Arg Gly Leu Ser Gln Asp  
 275 280 285  
 Pro Leu Tyr Lys Asn Arg Lys Thr Leu Leu Thr Thr His Lys Trp Leu  
 290 295 300

Ser Pro Arg Gln Gln Glu Ser Leu Glu Gln Leu Trp Ala Tyr Asp Lys  
 305 310 315 320  
 Asp Tyr Gly Val Leu Lys Leu Ala Trp Leu Ala Tyr Gln Ala Ile Ile  
 325 330 335  
 Asp Cys Tyr Gln Met Gly Asn Lys Arg Glu Ala Lys Lys Lys Met Arg  
 340 345 350  
 Thr Ile Ile Asp Gln Leu Arg Val Leu Lys Gly Pro Asn Lys Glu Leu  
 355 360 365  
 Ala Gln Leu Gly Arg Ser Leu Phe Lys Arg Leu Gly Asp Val Leu Ala  
 370 375 380  
 Tyr Phe Asp Val Gly Val Ser Asn Gly Pro Val Glu Ala Ile Asn Gly  
 385 390 395 400  
 Arg Leu Glu His Leu Arg Gly Ile Ala Leu Gly Phe Arg Asn Leu Thr  
 405 410 415  
 His Tyr Ile Leu Arg Cys Leu Ile His Ser Gly Gln Leu Thr His Lys  
 420 425 430  
 Ile Asn Ala Leu  
 435

【0103】配列番号：3

配列の長さ：15 base pairs

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

配列

GGCCCTTCCG GTTTT

アンチセンス：NO

起源

生物名：ブレヴィバクテリウム・ラクトファーメンタム (Brevibacteriu  
 m lactofermentum)

株名：AJ12036

15

【0104】配列番号：4

配列の長さ：15 base pairs

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

配列

GGCTCTTCCG TTTT

アンチセンス：YES

起源

生物名：ブレヴィバクテリウム・ラクトファーメンタム (Brevibacteriu  
 m lactofermentum)

株名：AJ12036

15

【0105】配列番号：5

配列の長さ：1453 base pairs

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

起源

生物名：ブレヴィバクテリウム・ラクトファーメンタム (Brevibacteriu  
 m lactofermentum)

株名：AJ12036

配列の特徴

特徴を表す記号：insertion seq

存在位置：1..1453

特徴を決定した方法：E

配列の特徴

特徴を表す記号：

存在位置：130..1440

特徴を決定した方法：S

配列の特徴

特徴を表す記号：repeat region

存在位置：1..15

特徴を決定した方法：S

配列の特徴

特徴を表す記号：repeat region

存在位置：1339..1453

特徴を決定した方法：S

配列の特徴

特徴を表す記号：-35 region

存在位置：71..76

特徴を決定した方法：S

## 配列の特徴

特徴を表す記号：-10 region

存在位置：92..97

特徴を決定した方法：S

## 配列

GGCCCTTCCG GTTTTGGGGT ACATCACAGA ACCTGGGCTA GCGGTGTAGA CCCGAAAATA	60
AACGAGCCTT TTGTCAGGGT TAAGGTTTAG GTATCTAAGC TAACCAAACA CCAACAAAAG	120
GCTCTACCC ATG AAG TCT ACC GGC AAC ATC ATC GCT GAC ACC ATC TGC	168
Met Lys Ser Thr Gly Asn Ile Ile Ala Asp Thr Ile Cys	
1 5 10	
CGC ACT GCG GAA CTA GGA CTC ACC ATC ACC GGC GCT TCC GAT GCA GGT	216
Arg Thr Ala Glu Leu Gly Leu Thr Ile Thr Gly Ala Ser Asp Ala Gly	
15 20 25	
GAT TAC ACC CTG ATC GAA GCA GAC GCA CTC GAC TAT ACC TCC ACC TGC	264
Asp Tyr Thr Leu Ile Glu Ala Asp Ala Leu Asp Tyr Thr Ser Thr Cys	
30 35 40 45	
CCA GAA TGC TTC CAA CCT GGG GTG TTT CGT CAT CAC ACC CAC CGG ATG	312
Pro Glu Cys Phe Gln Pro Gly Val Phe Arg His His Thr His Arg Met	
50 55 60	
CTC ATT GAT TTA CCC ATC GTC GGG TTT CCC ACC AAA CTG TTT ATC CGT	360
Leu Ile Asp Leu Pro Ile Val Gly Phe Pro Thr Lys Leu Phe Ile Arg	
65 70 75	
CTA CCT CGC TAC CGC TGC ACC AAC CCG ACA TGT AAG CAA AAG TAT TTC	408
Leu Pro Arg Tyr Arg Cys Thr Asn Pro Thr Cys Lys Gln Lys Tyr Phe	
80 85 90	
CAA GCA GAA CTA AGC TGC GCT GAC CAC GGT AAA AAG GTC ACC CAC CGG	456
Gln Ala Glu Leu Ser Cys Ala Asp His Gly Lys Lys Val Thr His Arg	
95 100 105	
GTC ACC CGC TGG ATT TTG CAA CGC CTT GCT ATT GAC CGG ATG AGT GTT	504
Val Thr Arg Trp Ile Leu Gln Arg Leu Ala Ile Asp Arg Met Ser Val	
110 115 120 125	
CAC GCA ACT GCG AAA GCA CTT GGG CTA GGG TGG GAT TTA ACC TGC CAA	552
His Ala Thr Ala Lys Ala Leu Gly Leu Gly Trp Asp Leu Thr Cys Gln	
130 135 140	
CTA GCC CTC GAT ATG TGC CGT GAG CTG GTC TAT AAC GAT CCT CAC CAT	600
Leu Ala Leu Asp Met Cys Arg Glu Leu Val Tyr Asn Asp Pro His His	
145 150 155	
CTT GAT GGA GTG TAT GTC ATT GGG GTG GAT GAG CAT AAG TGG TCA CAT	648
Leu Asp Gly Val Tyr Val Ile Gly Val Asp Glu His Lys Trp Ser His	
160 165 170	
AAT AGG GCT AAG CAT GGT GAT GGG TTT GTC ACC GTG ATT GTC GAT ATG	696
Asn Arg Ala Lys His Gly Asp Gly Phe Val Thr Val Ile Val Asp Met	
175 180 185	
ACC GGG CAT CGG TAT GAC TCA CGG TGT CCT GCC CGG TTA TTA GAT GTC	744
Thr Gly His Arg Tyr Asp Ser Arg Cys Pro Ala Arg Leu Leu Asp Val	
190 195 200 205	
GTC CCA GGT CGT AGT GCT GAT GCT TTA CGG TCC TGG CTT GGC TCC CGC	792
Val Pro Gly Arg Ser Ala Asp Ala Leu Arg Ser Trp Leu Gly Ser Arg	
210 215 220	
GGT GAA CAG TTC CGC AAT CAG ATA CGG ATC GTG TCC ATG GAT GGA TTC	840
Gly Glu Gln Phe Arg Asn Gln Ile Arg Ile Val Ser Met Asp Gly Phe	
225 230 235	

CAA GGC TAC GCC ACA GCA AGT AAA GAA CTC ATT CCT TCT GCT CGT CGC	888
Gln Gly Tyr Ala Thr Ala Ser Lys Glu Leu Ile Pro Ser Ala Arg Arg	
240 245 250	
GTG ATG GAT CCA TTC CAT GTT GTG CGG CTT GCT GGT GAC AAG CTC ACC	936
Val Met Asp Pro Phe His Val Val Arg Leu Ala Gly Asp Lys Leu Thr	
255 260 265	
GCC TGC CGG CAA CGC CTC CAG CGG GAG AAA TAC CAG CGT CGT GGT TTA	984
Ala Cys Arg Gln Arg Leu Gln Arg Glu Lys Tyr Gln Arg Arg Gly Leu	
270 275 280 285	
AGC CAG GAT CCG TTG TAT AAA AAC CGG AAG ACC TTG TTG ACC ACG CAC	1032
Ser Gln Asp Pro Leu Tyr Lys Asn Arg Lys Thr Leu Leu Thr Thr His	
290 295 300	
AAG TGG TTG AGT CCT CGT CAG CAA GAA AGC TTG GAG CAG TTG TGG GCG	1080
Lys Trp Leu Ser Pro Arg Gln Gln Glu Ser Leu Glu Gln Leu Trp Ala	
305 310 315	
TAT GAC AAA GAC TAC GGG GTG TTA AAG CTT GCG TGG CTT GCG TAT CAG	1128
Tyr Asp Lys Asp Tyr Gly Val Leu Lys Leu Ala Trp Leu Ala Tyr Gln	
320 325 330	
GCG ATT ATT GAT TGT TAT CAG ATG GGT AAT AAG CGT GAA GCG AAG AAG	1176
Ala Ile Ile Asp Cys Tyr Gln Met Gly Asn Lys Arg Glu Ala Lys Lys	
335 340 345	
AAA ATG CGG ACC ATT ATT GAT CAG CTT CGG GTG TTG AAG GGG CCG AAT	1224
Lys Met Arg Thr Ile Ile Asp Gln Leu Arg Val Leu Lys Gly Pro Asn	
350 355 360 365	
AAG GAA CTC GCG CAG TTG GGT CGT AGT TTG TTT AAA CGA CTT GGT GAT	1272
Lys Glu Leu Ala Gln Leu Gly Arg Ser Leu Phe Lys Arg Leu Gly Asp	
370 375 380	
GTG TTG GCG TAT TTC GAT GTT GGT GTC TCC AAC GGT CCG GTC GAA GCG	1320
Val Leu Ala Tyr Phe Asp Val Gly Val Ser Asn Gly Pro Val Glu Ala	
385 390 395	
ATC AAC GGA CGG TTG GAG CAT TTG CGT GGG ATT GCT CTA GGT TTC CGT	1368
Ile Asn Gly Arg Leu Glu His Leu Arg Gly Ile Ala Leu Gly Phe Arg	
400 405 410	
AAT TTG AAC CAC TAC ATT CTG CGG TGC CTT ATC CAT TCA GGG CAG TTG	1416
Asn Leu Asn His Tyr Ile Leu Arg Cys Leu Ile His Ser Gly Gln Leu	
415 420 425	
GTC CAT AAG ATC AAT GCA CTC TAA AACAGGAAGA GCC	1453
Val His Lys Ile Asn Ala Leu	
430 435	

【0106】配列番号：6

配列の長さ：436 amino acids

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：蛋白質

起源

生物名：ブレビバクテリウム・ラクトフェルメンタム

(Brevibacteriu

m lactofermentum)

株名：AJ12036

配列

Met Lys Ser Thr Gly Asn Ile Ile Ala Asp Thr Ile Cys Arg Thr Ala
1 5 10 15
Glu Leu Gly Leu Thr Ile Thr Gly Ala Ser Asp Ala Gly Asp Tyr Thr
20 25 30
Leu Ile Glu Ala Asp Ala Leu Asp Tyr Thr Ser Thr Cys Pro Glu Cys

35	40	45
Phe Gln Pro Gly Val	Phe Arg His His Thr	His Arg Met Leu Ile Asp
50	55	60
Leu Pro Ile Val Gly	Phe Pro Thr Lys Leu Phe	Ile Arg Leu Pro Arg
65	70	75
Tyr Arg Cys Thr Asn	Pro Thr Cys Lys Gln	Lys Tyr Phe Gln Ala Glu
85	90	95
Leu Ser Cys Ala Asp	His Gly Lys Lys Val	Thr His Arg Val Thr Arg
100	105	110
Trp Ile Leu Gln Arg	Leu Ala Ile Asp Arg	Met Ser Val His Ala Thr
115	120	125
Ala Lys Ala Leu Gly	Leu Gly Trp Asp Leu	Thr Cys Gln Leu Ala Leu
130	135	140
Asp Met Cys Arg Glu	Leu Val Tyr Asn Asp	Pro His His Leu Asp Gly
145	150	155
Val Tyr Val Ile Gly	Val Asp Glu His Lys	Trp Ser His Asn Arg Ala
165	170	175
Lys His Gly Asp Gly	Phe Val Thr Val Ile	Val Asp Met Thr Gly His
180	185	190
Arg Tyr Asp Ser Arg	Cys Pro Ala Arg Leu	Leu Asp Val Val Pro Gly
195	200	205
Arg Ser Ala Asp Ala	Leu Arg Ser Trp Leu	Gly Ser Arg Gly Glu Gln
210	215	220
Phe Arg Asn Gln Ile	Arg Ile Val Ser Met	Asp Gly Phe Gln Gly Tyr
225	230	235
Ala Thr Ala Ser Lys	Glu Leu Ile Pro Ser	Ala Arg Arg Val Met Asp
245	250	255
Pro Phe His Val Val	Arg Leu Ala Gly Asp	Lys Leu Thr Ala Cys Arg
260	265	270
Gln Arg Leu Gln Arg	Glu Lys Tyr Gln Arg	Arg Gly Leu Ser Gln Asp
275	280	285
Pro Leu Tyr Lys Asn	Arg Lys Thr Leu Leu	Thr Thr His Lys Trp Leu
290	295	300
Ser Pro Arg Gln Gln	Glu Ser Leu Glu Gln	Leu Trp Ala Tyr Asp Lys
305	310	315
Asp Tyr Gly Val Leu	Lys Leu Ala Trp Leu	Ala Tyr Gln Ala Ile Ile
325	330	335
Asp Cys Tyr Gln Met	Gly Asn Lys Arg Glu	Ala Lys Lys Lys Met Arg
340	345	350
Thr Ile Ile Asp Gln	Leu Arg Val Leu Lys	Gly Pro Asn Lys Glu Leu
355	360	365
Ala Gln Leu Gly Arg	Ser Leu Phe Lys Arg	Leu Gly Asp Val Leu Ala
370	375	380
Tyr Phe Asp Val Gly	Val Ser Asn Gly Pro	Val Glu Ala Ile Asn Gly
385	390	395
Arg Leu Glu His Leu	Arg Gly Ile Ala Leu	Gly Phe Arg Asn Leu Asn
405	410	415
His Tyr Ile Leu Arg	Cys Leu Ile His Ser	Gly Gln Leu Val His Lys
420	425	430
Ile Asn Ala Leu		

## 【0107】配列番号：7

配列の長さ：15 base pairs

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

配列

GGCCCTCCG GTTTT

15

## 【0108】配列番号：8

配列の長さ：15 base pairs

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

配列

GGCTCTCCG GTTTT

15

## 【0109】配列番号：9

配列の長さ：1279 base pairs

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

起源

生物名：ブレバクテリウム・ラクトフェルメンタム (Brevibacterium lactofermentum)

株名：AJ12036

配列の特徴

アンチセンス：NO

起源

生物名：ブレバクテリウム・ラクトフェルメンタム (Brevibacterium lactofermentum)

株名：AJ12036

アンチセンス：YES

起源

生物名：ブレバクテリウム・ラクトフェルメンタム (Brevibacterium lactofermentum)

株名：AJ12036

特徴を表す記号：insertion seq

存在位置：1..1279

配列の特徴

特徴を表す記号：repeat region

存在位置：1..14

特徴を決定した方法：S

配列の特徴

特徴を表す記号：repeat region

存在位置：1266..1279

特徴を決定した方法：S

配列

GGGACTGACC CCTGTTTGGT GGACACCTTG AAACCAGCAT GATGCTGGAA AGGTAATCTG	60
CCACCATGCC ACGCAAGACC TATACAGAGG AGTTCAAGCG CGATGCCGTC GCCTTGACG	120
AGAACTCCCC AGAGGCTTCG ATCCAGACCA TCGCCACCGA TCTCGGGGTC AACCGCGCCA	180
CGTTGGCGAA CTGGGTGAAA AAATACGGCA CCGCAGGCTC CCAACGAAAC ACCCTCGCCA	240
GCCTCTGTGA ACGAGGCTGA GCAGATCCGG AAATGGAAC GGGAAAACGC TCGCTTGAGA	300
GAAGAGCGCG ATATCCTGCG GAAAGCTGCA AAATATTTG CGGAAGAGAC GAATTCGTGA	360
TCCGTTCCG GTTCGTTGAT GACGCTCCA AGACCTACTC GGTCAAGCGG ATATGTGACG	420
TCCTCAAACT CAACAGGTCT TCCTACTATA AATGGAAGG TACCTGCTCA GCACGCAGGA	480
AACGCTCAT GTCGACGCGA TCCTCGGGG TCGAGTCAAG GCTGTCTTCA CCACGAAAA	540
TGGTTGTTAT GGGGCCAAGC GGATCACCGC TGAATCAAA GACCAGGTGG ATCATGACCC	600
CGTAAATCAC AAGCGGGTCG CTCGGGTGAT GCGCTCGTTG AAGCTGTTG GCTACACAAA	660
TAAACGCAAG GTCACCACCA CTGTGTCGGA TAAACCAAG ACAGTGTTC CTGACCTTGT	720
CGGCCGGAAG TTCACCGCTA ATAAGCCAAA TCAGGTGTAC GTGGGACAT CACGTACCTG	780
CCGATTGCTG ATGGGTGAA TATGTACCTG GCTACGGTCA TTGACTGCTA TTCCGCGAGG	840
TTGGTGGGCT TTTCTATCGC ACATCACATG CGTACCTCCC TGGTGACAGC GCGCTGCTGA	900
TGGCTAAGGG CCAGCGCGAA GCTGACGGGG GCGATCTTTC ACTCGGATCA CGGAAGTGTT	960
TACACTTCTC ACGCATTCCTA GACACCTGTA AAGACCTGGG ATAAGGCAGT CGATGGGATC	1020
AATCGGCACC AGTCGACAA TGCTCGCGG AGTCCTTCAA CGCAGCACTG AAGCGGAAGT	1080
CCTCCAGGAT TCCAAGACAT TCATGAACCA GTTCCGCTGT CGCCGGGACG TCTTCGCTG	1140
GTGTACCCGC TACAACATGG TGCGCGGCA TTCTGCTGT AAATATCTCG CCCTGCGGTG	1200
TTTGAGAAGC GCTGTCCTGC TATCCTGAAA TCTGCTTCCT GATCAAATCC TCCGTGTCTA	1260

CTATCCGGGG GTCGGGCCC		1279
【0110】配列番号: 10	アンチセンス: NO	
配列の長さ: 14 base pairs	起源	
配列の型: 核酸	生物名: ブレバクテリウム・ラクトフェルメンタム (Brevibacteriu	
鎖の数: 二本鎖	m lactofermentum)	
トポロジー: 直鎖状	株名: AJ12036	
配列の種類: Genomic DNA		
配列		
GGGACTGACC CCTG		14
【0111】配列番号: 11	アンチセンス: YES	
配列の長さ: 14 base pairs	起源	
配列の型: 核酸	生物名: ブレバクテリウム・ラクトフェルメンタム (Brevibacteriu	
鎖の数: 二本鎖	m lactofermentum)	
トポロジー: 直鎖状	株名: AJ12036	
配列の種類: Genomic DNA		
配列		
GGGCCCGACC CCGG		14
【0112】配列番号: 12	鎖の数: 二本鎖	
配列の長さ: 8 bases	トポロジー: 直鎖状	
配列の型: 核酸		
配列		
GGTTTATT		8
【0113】配列番号: 13	トポロジー: 直鎖状	
配列の長さ: 23 bases	配列の種類: 他の核酸 合成DNA	
配列の型: 核酸	アンチセンス: NO	
鎖の数: 一本鎖		
配列		
GTGGAGCCGA CCATTCCGGG AGG		23
【0114】配列番号: 14	トポロジー: 直鎖状	
配列の長さ: 23 bases	配列の種類: 他の核酸 合成DNA	
配列の型: 核酸	アンチセンス: YES	
鎖の数: 一本鎖		
配列		
CCAAAACCGC CCTCCACGGC GAA		23
【0115】配列番号: 15	m lactofermentum)	
配列の長さ: 3579 base pairs	株名: ATCC 13869	
配列の型: 核酸	配列の特徴:	
鎖の数: 二本鎖	特徴を表す記号: CDS	
トポロジー: 直鎖状	存在位置: 533..2182	
配列の種類: Genomic DNA	配列の特徴:	
起源:	特徴を表す記号: CDS	
生物名: ブレバクテリウム・ラクトフェルメンタム (Brevibacteriu	存在位置: 2188..3522	
配列		
GTGGAGCCGA CCATTCCGGG AGGCTGCACT GCAACGAGGT CGTAGTTTGT GTACATGGCT	60	
TCTGGCCAGT TCATGGATTG GCTGCCGAAG AAGCTATAGG CATCGCACCA GGGCCACCGA	120	
GTTACCGAAG ATGGTGCCGT GCTTTTCGCC TTGGGCAGGG ACCTTGACAA AGCCACGCT	180	
GATATCGCCA AGTGAGGGAT CAGAATAGTG CATGGGCACG TCGATGCTGC CACATTGAGC	240	
GGAGGCAATA TCTACCTGAG GTGGGCATTG TTCCACGGG ATGTTTCTT GCGCTGCTGC	300	
AGTGGGCATT GATACAAAA AGGGGCTAAG CGCAGTCGAG GCGCAAGAA CTGCTACTAC	360	
CCTTTTATT GTCGAACGGG GCATTACGGC TCCAAGGACG TTTGTTTCT GGGTCAGTTA	420	



CCCCCAAAAG CATATACAGA GACCAATGAT TTTTCATTAA AAAGGCAGGG ATTTGTTATA 480  
 AGTATGGGTC GTATTCTGTG CGACGGGTGT ACCTCGGCTA GAATTCTCC CC ATG 535  
 Met  
 1  
 ACA CCA GCT GAT CTC GCA ACA TTG ATT AAA GAG ACC GCG GTA GAG GTT 583  
 Thr Pro Ala Asp Leu Ala Thr Leu Ile Lys Glu Thr Ala Val Glu Val  
 5 10 15  
 TTG ACC TCC CGC GAG CTC GAT ACT TCT GTT CTT CCG GAG CAG GTA GTT 631  
 Leu Thr Ser Arg Glu Leu Asp Thr Ser Val Leu Pro Glu Gln Val Val  
 20 25 30  
 GTG GAG CGT CCG CGT AAC CCA GAG CAC GGC GAT TAC GGC ACC AAC ATT 679  
 Val Glu Arg Pro Arg Asn Pro Glu His Gly Asp Tyr Ala Thr Asn Ile  
 35 40 45  
 GCA TTG CAG GTG GCT AAA AAG GTC GGT CAG AAC CCT CGG GAT TTG GCT 727  
 Ala Leu Gln Val Ala Lys Lys Val Gly Gln Asn Pro Arg Asp Leu Ala  
 50 55 60 65  
 ACC TGG CTG GCA GAG GCA TTG GCT GCA GAT GAC GCC ATT GAT TCT GCT 775  
 Thr Trp Leu Ala Glu Ala Leu Ala Ala Asp Asp Ala Ile Asp Ser Ala  
 70 75 80  
 GAA ATT GCT GGC CCA GGC TTT TTG AAC ATT CGC CTT GCT GCA GCA GCA 823  
 Glu Ile Ala Gly Pro Gly Phe Leu Asn Ile Arg Leu Ala Ala Ala Ala  
 85 90 95  
 CAG GGT GAA ATT GTG GCC AAG ATT CTG GCA CAG GGC GAG ACT TTC GGA 871  
 Gln Gly Glu Ile Val Ala Lys Ile Leu Ala Gln Gly Glu Thr Phe Gly  
 100 105 110  
 AAC TCC GAT CAC CTT TCC CAC TTG GAC GTG AAC CTC GAG TTC GTT TCT 919  
 Asn Ser Asp His Leu Ser His Leu Asp Val Asn Leu Glu Phe Val Ser  
 115 120 125  
 GCA AAC CCA ACC GGA CCT ATT CAC CTT GGC GGA ACC CGC TGG GCT GCC 967  
 Ala Asn Pro Thr Gly Pro Ile His Leu Gly Gly Thr Arg Trp Ala Ala  
 130 135 140 145  
 GTG GGT GAC TCT TTG GGT CGT GTG CTG GAG GCT TCC GGC GCG AAA GTG 1015  
 Val Gly Asp Ser Leu Gly Arg Val Leu Glu Ala Ser Gly Ala Lys Val  
 150 155 160  
 ACC CGC GAA TAC TAC TTC AAC GAT CAC GGT CGC CAG ATC GAT CGT TTC 1063  
 Thr Arg Glu Tyr Tyr Phe Asn Asp His Gly Arg Gln Ile Asp Arg Phe  
 165 170 175  
 GCT TTG TCC CTT CTT GCA GCG GCG AAG GGC GAG CCA ACG CCA GAA GAC 1111  
 Ala Leu Ser Leu Leu Ala Ala Ala Lys Gly Glu Pro Thr Pro Glu Asp  
 180 185 190  
 GGT TAT GGC GGC GAA TAC ATT AAG GAA ATT GCG GAG GCA ATC GTC GAA 1159  
 Gly Tyr Gly Gly Glu Tyr Ile Lys Glu Ile Ala Glu Ala Ile Val Glu  
 195 200 205  
 AAG CAT CCT GAA GCG TTG GCT TTG GAG CCT GCC GCA ACC CAG GAG CTT 1207  
 Lys His Pro Glu Ala Leu Ala Leu Glu Pro Ala Ala Thr Gln Glu Leu  
 210 215 220 225  
 TTC CGC GCT GAA GGC GTG GAG ATG ATG TTC GAG CAC ATC AAA TCT TCC 1255  
 Phe Arg Ala Glu Gly Val Glu Met Met Phe Glu His Ile Lys Ser Ser  
 230 235 240  
 CTG CAT GAG TTC GGC ACC GAT TTC GAT GTC TAC TAC CAC GAG AAC TCC 1303

Leu His Glu Phe Gly Thr Asp Phe Asp Val Tyr Tyr His Glu Asn Ser	
245 250 255	
CTG TTC GAG TCC GGT GCG GTG GAC AAG GCC GTG CAG GTG CTG AAG GAC	1351
Leu Phe Glu Ser Gly Ala Val Asp Lys Ala Val Gln Val Leu Lys Asp	
260 265 270	
AAC GGC AAC CTG TAC GAA AAC GAG GGC GCT TGG TGG CTG CGT TCC ACC	1399
Asn Gly Asn Leu Tyr Glu Asn Glu Gly Ala Trp Trp Leu Arg Ser Thr	
275 280 285	
GAA TTC GGC GAT GAC AAA GAC CGC GTG GTG ATC AAG TCT GAC GGC GAC	1447
Glu Phe Gly Asp Asp Lys Asp Arg Val Val Ile Lys Ser Asp Gly Asp	
290 295 300 305	
GCA GCC TAC ATC GCT GGC GAT ATC GCG TAC GTG GCT GAT AAG TTC TCC	1495
Ala Ala Tyr Ile Ala Gly Asp Ile Ala Tyr Val Ala Asp Lys Phe Ser	
310 315 320	
CGC GGA CAC AAC CTA AAC ATC TAC ATG TTG GGT GCT GAC CAC CAT GGT	1543
Arg Gly His Asn Leu Asn Ile Tyr Met Leu Gly Ala Asp His His Gly	
325 330 335	
TAC ATC GCG CGC CTG AAG GCA GCG GCG GCA CTT GGC TAC AAG CCA	1591
Tyr Ile Ala Arg Leu Lys Ala Ala Ala Ala Ala Leu Gly Tyr Lys Pro	
340 345 350	
GAA GGC GTT GAA GTC CTG ATT GGC CAG ATG GTG AAC CTG CTT CGC GAC	1639
Glu Gly Val Glu Val Leu Ile Gly Gln Met Val Asn Leu Leu Arg Asp	
355 360 365	
GGC AAG GCA GTG CGT ATG TCC AAG CGT GCA GGC ACC GTG GTC ACC CTA	1687
Gly Lys Ala Val Arg Met Ser Lys Arg Ala Gly Thr Val Val Thr Leu	
370 375 380 385	
GAT GAC CTC GTT GAA GCA ATC GGC ATC GAT GCG GCG CGT TAC TCC CTG	1735
Asp Asp Leu Val Glu Ala Ile Gly Ile Asp Ala Ala Arg Tyr Ser Leu	
390 395 400	
ATC CGT TCC TCC GTG GAT TCT TCC CTG GAT ATC GAT CTC GGC CTG TGG	1783
Ile Arg Ser Ser Val Asp Ser Ser Leu Asp Ile Asp Leu Gly Leu Trp	
405 410 415	
GAA TCC CAG TCC TCC GAC AAC CCT GTG TAC TAC GTG CAG TAC GGA CAC	1831
Glu Ser Gln Ser Ser Asp Asn Pro Val Tyr Tyr Val Gln Tyr Gly His	
420 425 430	
GCT CGT CTG TGC TCC ATC GCG CGC AAG GCA GAG ACC TTG GGT GTC ACC	1879
Ala Arg Leu Cys Ser Ile Ala Arg Lys Ala Glu Thr Leu Gly Val Thr	
435 440 445	
GAG GAA GGC GCA GAC CTA TCT CTA CTG ACC CAC GAC CGC GAA GGC GAT	1927
Glu Glu Gly Ala Asp Leu Ser Leu Leu Thr His Asp Arg Glu Gly Asp	
450 455 460 465	
CTC ATC GCG ACA CTC GGA GAG TTC CCA GCA GTG GTG AAG GCT GCC GCT	1975
Leu Ile Arg Thr Leu Gly Glu Phe Pro Ala Val Val Lys Ala Ala Ala	
470 475 480	
GAC CTA CGT GAA CCA CAC CGC ATT GCC CGC TAT GCT GAG GAA TTA GCT	2023
Asp Leu Arg Glu Pro His Arg Ile Ala Arg Tyr Ala Glu Glu Leu Ala	
485 490 495	
GGA ACT TTC CAC CGC TTC TAC GAT TCC TGC CAC ATC CTT CCA AAG GTT	2071
Gly Thr Phe His Arg Phe Tyr Asp Ser Cys His Ile Leu Pro Lys Val	
500 505 510	

GAT GAG GAT ACG GCA CCA ATC CAC ACA GCA CGT CTG GCA CTT GCA GCA Asp Glu Asp Thr Ala Pro Ile His Thr Ala Arg Leu Ala Leu Ala Ala	2119
515 520 525	
GCA ACC CGC CAG ACC CTC GCT AAC GCC CTG CAC CTG GTT GGC GTT TCC Ala Thr Arg Gln Thr Leu Ala Asn Ala Leu His Leu Val Gly Val Ser	2167
530 535 540 545	
GCA CCG GAG AAG ATG TAACA ATG GCT ACA GTT GAA AAT TTC AAT GAA Ala Pro Glu Lys Met Met Ala Thr Val Glu Asn Phe Asn Glu	2214
550 1 5	
CTT CCC GCA CAC GTA TGG CCA CGC AAT GCC GTG CGC CAA GAA GAC GGC Leu Pro Ala His Val Trp Pro Arg Asn Ala Val Arg Gln Glu Asp Gly	2262
10 15 20 25	
GTT GTC ACC GTC GCT GGT GTG CCT CTG CCT GAC CTC GCT GAA GAA TAC Val Val Thr Val Ala Gly Val Pro Leu Pro Asp Leu Ala Glu Glu Tyr	2310
30 35 40	
GGA ACC CCA CTG TTC GTA GTC GAC GAG GAC GAT TTC CGT TCC CGC TGT Gly Thr Pro Leu Phe Val Val Asp Glu Asp Asp Phe Arg Ser Arg Cys	2358
45 50 55	
CGC GAC ATG GCT ACC GCA TTC GGT GGA CCA GGC AAT GTG CAC TAC GCA Arg Asp Met Ala Thr Ala Phe Gly Gly Pro Gly Asn Val His Tyr Ala	2406
60 65 70	
TCT AAA GCG TTC CTG ACC AAG ACC ATT GCA CGT TGG GTT GAT GAA GAG Ser Lys Ala Phe Leu Thr Lys Thr Ile Ala Arg Trp Val Asp Glu Glu	2454
75 80 85	
GGG CTG GCA CTG GAC ATT GCA TCC ATC AAC GAA CTG GGC ATT GCC CTG Gly Leu Ala Leu Asp Ile Ala Ser Ile Asn Glu Leu Gly Ile Ala Leu	2502
90 95 100 105	
GCC GCT GGT TTC CCC GCC AGC CGT ATC ACC GCG CAC GGC AAC AAC AAA Ala Ala Gly Phe Pro Ala Ser Arg Ile Thr Ala His Gly Asn Asn Lys	2550
110 115 120	
GGC GTA GAG TTC CTG CGC GCG TTG GTT CAA AAC GGT GTG GGA CAC GTG Gly Val Glu Phe Leu Arg Ala Leu Val Gln Asn Gly Val Gly His Val	2598
125 130 135	
GTG CTG GAC TCC GCA CAG GAA CTA GAA CTG TTG GAT TAC GTT GCC GCT Val Leu Asp Ser Ala Gln Glu Leu Glu Leu Leu Asp Tyr Val Ala Ala	2646
140 145 150	
GGT GAA GGC AAG ATT CAG GAC GTG TTG ATC CGC GTA AAG CCA GGC ATC Gly Glu Gly Lys Ile Gln Asp Val Leu Ile Arg Val Lys Pro Gly Ile	2694
155 160 165	
GAA GCA CAC ACC CAC GAG TTC ATC GCC ACT AGC CAC GAA GAC CAG AAG Glu Ala His Thr His Glu Phe Ile Ala Thr Ser His Glu Asp Gln Lys	2742
170 175 180 185	
TTC GGA TTC TCC CTG GCA TCC GGT TCC GCA TTC GAA GCA GCA AAA GCC Phe Gly Phe Ser Leu Ala Ser Gly Ser Ala Phe Glu Ala Ala Lys Ala	2790
190 195 200	
GCC AAC AAC GCA GAA AAC CTG AAC CTG GTT GGC CTG CAC TGC CAC GTT Ala Asn Asn Ala Glu Asn Leu Asn Leu Val Gly Leu His Cys His Val	2838
205 210 215	
GGT TCC CAG GTG TTC GAC GCC GAA GGC TTC AAG CTG GCA GCA GAA CGC Gly Ser Gln Val Phe Asp Ala Glu Gly Phe Lys Leu Ala Ala Glu Arg	2886

220	225	230	
GTG TTG GGC CTG TAC TCA CAG ATC CAC AGC GAA CTG GGC GTT GCC CTT			2934
Val Leu Gly Leu Tyr Ser Gln Ile His Ser Glu Leu Gly Val Ala Leu			
235	240	245	
CCT GAA CTG GAT CTC GGT GGC GGA TAC GGC ATT GCC TAT ACC GCA GCT			2982
Pro Glu Leu Asp Leu Gly Gly Gly Tyr Gly Ile Ala Tyr Thr Ala Ala			
250	255	260	265
GAA GAA CCA CTC AAC GTC GCA GAA GTT GCC TCC GAC CTG CTC ACC GCA			3030
Glu Glu Pro Leu Asn Val Ala Glu Val Ala Ser Asp Leu Leu Thr Ala			
270	275	280	
GTC GGA AAA ATG GCA GCG GAA CTA GGC ATC GAC GCA CCA ACC GTG CTT			3078
Val Gly Lys Met Ala Ala Glu Leu Gly Ile Asp Ala Pro Thr Val Leu			
285	290	295	
GTT GAG CCC GGC CGC GCT ATC GCA GGC CCC TCC ACC GTG ACC ATC TAC			3126
Val Glu Pro Gly Arg Ala Ile Ala Gly Pro Ser Thr Val Thr Ile Tyr			
300	305	310	
GAA GTC GGC ACC ACC AAA GAC GTC CAC GTA GAC GAC GAC AAA ACC CGC			3174
Glu Val Gly Thr Thr Lys Asp Val His Val Asp Asp Asp Lys Thr Arg			
315	320	325	
CGT TAC ATC GCC GTG GAC GGA GGC ATG TCC GAC AAC ATC CGC CCA GCA			3222
Arg Tyr Ile Ala Val Asp Gly Gly Met Ser Asp Asn Ile Arg Pro Ala			
330	335	340	345
CTC TAC GGC TCC GAA TAC GAC GCC CGC GTA GTA TCC CGC TTC GCC GAA			3270
Leu Tyr Gly Ser Glu Tyr Asp Ala Arg Val Val Ser Arg Phe Ala Glu			
350	355	360	
GGA GAC CCA GTA AGC ACC CGC ATC GTG GGC TCC CAC TGC GAA TCC GGC			3318
Gly Asp Pro Val Ser Thr Arg Ile Val Gly Ser His Cys Glu Ser Gly			
365	370	375	
GAT ATC CTG ATC AAC GAT GAA ATC TAC CCA TCT GAC ATC ACC AGC GGC			3366
Asp Ile Leu Ile Asn Asp Glu Ile Tyr Pro Ser Asp Ile Thr Ser Gly			
380	385	390	
GAC TTC CTT GCA CTC GCA GCC ACC GGC GCA TAC TGC TAC GCC ATG AGC			3414
Asp Phe Leu Ala Leu Ala Ala Thr Gly Ala Tyr Cys Tyr Ala Met Ser			
395	400	405	
TCC CGC TAC AAC GCC TTC ACA CGG CCC GCC GTC GTG TCC GTC CGC GCT			3462
Ser Arg Tyr Asn Ala Phe Thr Arg Pro Ala Val Val Ser Val Arg Ala			
410	415	420	425
GGC AGC TCC CGC CTC ATG CTG CGC CGC GAA ACG CTC GAC GAC ATC CTC			3510
Gly Ser Ser Arg Leu Met Leu Arg Arg Glu Thr Leu Asp Asp Ile Leu			
430	435	440	
TCA CTA GAG GCA TAAAGCTTTT CGACGCCTGA CCCC GCCCTT CACCTTCGCC			3562
Ser Leu Glu Ala			
445			
GTGGAGGGCG GTTTTGG			3579

【0116】配列番号：16

配列の長さ：23 bases

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

アンチセンス：NO

配列

GTCGACGGAT CGCAAATGGC AAC

## 【0117】配列番号: 17

配列の長さ: 23 bases

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

アンチセンス: YES

## 配列

GGATCCTGA GCACCTGCG CAG

23

## 【0118】配列番号: 18

配列の長さ: 1411 base pairs

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: Genomic DNA

起源:

生物名: ブレヴィバクテリウム・ラクトファーメンタム (Brevibacteriu  
m lactofermentum)

株名: ATCC 13869

配列の特徴:

特徴を表す記号: CDS

存在位置: 311..1213

## 配列

CTCTCGATAT CGAGAGAGAA GCAGCGCCAC GGTITTTTCGG TGATTTTGAG ATTGAAACTT	60
TGGCAGACGG ATCGCAAATG GCAACAAGCC CGTATGTCAT GGACTTTTAA CGCAAAGCTC	120
ACACCCACGA GCTAAAAATT CATATAGTTA AGACAACATT TTTGGCTGTA AAAGACAGCC	180
GTAAAAACCT CTTGCTCATG TCAATTGTTC TTATCGGAAT GTGGCTTGGG CGATTGTTAT	240
GCAAAAGTTG TTAGGTTTTT TCGGGGGTTG TTTAACCCCC AAATGAGGGA AGAAGGTAAC	300
CTTGAACCTCT ATG AGC ACA GGT TTA ACA GCT AAG ACC GGA GTA GAG CAC	349
Met Ser Thr Gly Leu Thr Ala Lys Thr Gly Val Glu His	
1 5 10	
TTC GGC ACC GTT GGA GTA GCA ATG GTT ACT CCA TTC ACG GAA TCC GGA	397
Phe Gly Thr Val Gly Val Ala Met Val Thr Pro Phe Thr Glu Ser Gly	
15 20 25	
GAC ATC GAT ATC GCT GCT GGC CGC GAA GTC GCG GCT TAT TTG GTT GAT	445
Asp Ile Asp Ile Ala Ala Gly Arg Glu Val Ala Ala Tyr Leu Val Asp	
30 35 40 45	
AAG GGC TTG GAT TCT TTG GTT CTC GCG GGC ACC ACT GGT GAA TCC CCA	493
Lys Gly Leu Asp Ser Leu Val Leu Ala Gly Thr Thr Gly Glu Ser Pro	
50 55 60	
ACG ACA ACC GCC GCT GAA AAA CTA GAA CTG CTC AAG GCC GTT CGT GAG	541
Thr Thr Thr Ala Ala Glu Lys Leu Glu Leu Leu Lys Ala Val Arg Glu	
65 70 75	
GAA GTT GGG GAT CCG GCG AAC GTC ATC GCC GGT GTC GGA ACC AAC AAC	589
Glu Val Gly Asp Arg Ala Asn Val Ile Ala Gly Val Gly Thr Asn Asn	
80 85 90	
ACG CGG ACA TCT GTG GAA CTT GCG GAA GCT GCT GCT TCT GCT GGC GCA	637
Thr Arg Thr Ser Val Glu Leu Ala Glu Ala Ala Ala Ser Ala Gly Ala	
95 100 105	
GAC GGC CTT TTA GTT GTA ACT CCT TAT TAC TCC AAG CCG AGC CAA GAG	685
Asp Gly Leu Leu Val Val Thr Pro Tyr Tyr Ser Lys Pro Ser Gln Glu	
110 115 120 125	
GGA TTG CTG GCG CAC TTC GGT GCA ATT GCT GCA GCA ACA GAG GTT CCA	733
Gly Leu Leu Ala His Phe Gly Ala Ile Ala Ala Ala Thr Glu Val Pro	
130 135 140	
ATT TGT CTC TAT GAC ATT CCT GGT CGG TCA GGT ATT CCA ATT GAG TCT	781
Ile Cys Leu Tyr Asp Ile Pro Gly Arg Ser Gly Ile Pro Ile Glu Ser	
145 150 155	

GAT ACC ATG AGA CGC CTG AGT GAA TTA CCT ACG ATT TTG GCG GTC AAG	829
Asp Thr Met Arg Arg Leu Ser Glu Leu Pro Thr Ile Leu Ala Val Lys	
160 165 170	
GAC GCC AAG GGT GAC CTC GTT GCA GCC ACG TCA TTG ATC AAA GAA ACG	877
Asp Ala Lys Gly Asp Leu Val Ala Ala Thr Ser Leu Ile Lys Glu Thr	
175 180 185	
GGA CTT GCC TGG TAT TCA GGC GAT GAC CCA CTA AAC CTT GTT TGG CTT	925
Gly Leu Ala Trp Tyr Ser Gly Asp Asp Pro Leu Asn Leu Val Trp Leu	
190 195 200 205	
GCT TTG GGC GGA TCA GGT TTC ATT TCC GTA ATT GGA CAT GCA GCC CCC	973
Ala Leu Gly Gly Ser Gly Phe Ile Ser Val Ile Gly His Ala Ala Pro	
210 215 220	
ACA GCA TTA CGT GAG TTG TAC ACA AGC TTC GAG GAA GGC GAC CTC GTC	1021
Thr Ala Leu Arg Glu Leu Tyr Thr Ser Phe Glu Glu Gly Asp Leu Val	
225 230 235	
CGT GCG CGG GAA ATC AAC GCC AAA CTA TCA CCG CTG GTA GCT GCC CAA	1069
Arg Ala Arg Glu Ile Asn Ala Lys Leu Ser Pro Leu Val Ala Ala Gln	
240 245 250	
GGT CGC TTG GGT GGA GTC AGC TTG GCA AAA GCT GCT CTG CGT CTG CAG	1117
Gly Arg Leu Gly Gly Val Ser Leu Ala Lys Ala Ala Leu Arg Leu Gln	
255 260 265	
GGC ATC AAC GTA GGA GAT CCT CGA CTT CCA ATT ATG GCT CCA AAT GAG	1165
Gly Ile Asn Val Gly Asp Pro Arg Leu Pro Ile Met Ala Pro Asn Glu	
270 275 280 285	
CAG GAA CTT GAG GCT CTC CGA GAA GAC ATG AAA AAA GCT GGA GTT CTA	1213
Gln Glu Leu Glu Ala Leu Arg Glu Asp Met Lys Lys Ala Gly Val Leu	
290 295 300	
TAAATATGAA TGATTCCCGA AATCGCGGCC GGAAGGTTAC CCGCAAGGCG GCCCACCAGA	1273
AGCTGGTCAG GAAAACCATC TGGATACCCC TGTCTTTCAG GCACCAGATG CTTCTCTTAA	1333
CCAGAGCGCT GTAAAAGCTG AGACCGCCGG AAACGACAAT CGGGATGCTG CGCAAGGTGC	1393
TCAAGGATCC CAACATTC	1411

【0119】配列番号：19

配列の長さ：23 bases

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

アンチセンス：NO

配列

TCGCGAAGTA GCACCTGTCA CTT

23

【0120】配列番号：20

配列の長さ：21 bases

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

アンチセンス：YES

配列

ACGGAATTCA ATCTTACGGC C

21

【0121】配列番号：21

配列の長さ：1643 base pairs

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

起源：

生物名：ブレビバクテリウム・ラクトfermentum (Brevibacteriu  
m lactofermentum)

株名：ATCC 13869

配列

TCGCGAAGTA GCACCTGTCA CTTTTGTCTC AAATATTTAA TCGAATATCA ATATACGGTC

60

TGTATTATTGG AACGCATCCC AGTGGCTGAG ACGCATCCGC TAAAGCCCCA GGAACCCCTGT 120  
 GCAGAAAGAA AACACTCCTC TGGCTAGGTA GACACAGTTT ATAAAGGTAG AGTTGAGCGG 180  
 GTAACGTGCA GCACGTAGAT CGAAAGGTGC ACAAAGGTGG CCCTGGTCGT ACAGAAATAT 240  
 GCGCGTTCCT CGCTTGAGAG TCGGAACGC ATTAGAAACG TCGCTGAACG GATCGTTGCC 300  
 ACCAAGAAGG CTGGAATGA TGTCTGGTT GTCTGCTCCG CAATGGGAGA CACCACGGAT 360  
 GAACTTCTAG AACTTGCAGC GGCAGTGAAT CCCGTTCGCG CAGCTCGTGA AATGGATATG 420  
 CTCTGACTG CTGGTGAGCG TATTTCTAAC GCTCTCGTCG CCATGGCTAT TGAGTCCCTT 480  
 GCGCAGAAG CTCAATCTTT CACTGGCTCT CAGGCTGGTG TGCTCACCAC CGAGCGGCAC 540  
 GGAAACGCAC GCATTGTTGA CGTCACACCG GGTCTGTGTC GTGAAGCACT CGATGAGGGC 600  
 AAGATCTGCA TTGTTGCTGG TTTTCAGGGT GTTAATAAAG AAACCCGCGA TGTACCACG 660  
 TTGGGTCTG GTGTTCTGA CACCACTGCA GTTGGCTTGG CAGCTGCTTT GAACGCTGAT 720  
 GTGTGTGAGA TTTACTCGGA CGTTGACGGT GTGTATACCG CTGACCCGCG CATCGTTCCT 780  
 AATGCACAGA AGCTGGA AAA GCTCAGCTTC GAAGAAATGC TGGAACTGC TGCTGTGGC 840  
 TCCAAGATTT TGGTCTGCG CAGTGTGAA TACGCTCGTG CATTCAATGT GCCACTTCGC 900  
 GTACGCTCGT CTTATAGTAA TGATCCCGGC ACTTTGATTG CCGGCTCTAT GGAGGATATT 960  
 CCTGTGGAAG AAGCAGTCTT TACCGGTGTC GCAACCGACA AGTCCGAAGC CAAAGTAACC 1020  
 GTTCTGGGTA TTTCCGATAA GCCAGGCGAG GCTGCCAAGG TTTCCGTCG GTTGGCTGAT 1080  
 GCAGAAATCA ACATTGACAT GGTCTGCAG AACGTCTCCT CTGTGGAAGA CGGCACCACC 1140  
 GACATCAGT TCACTGCCC TCGCGCTGAC GGAACCGCTG CGATGGAGAT CTTGAAGAAG 1200  
 CTTACAGTTC AGGGCAACTG GAACCAATGT CTTTACGACG ACCAGGTCGG CAAAGTCTCC 1260  
 CTCGTGGTG CTGGCATGAA GTCTACCCA GGTGTTACCG CAGAGTTCAT GGAAGCTCTG 1320  
 CGCGATGCA ACGTGAACAT CGAATTGATT TCCACCTCTG AGATCCGCAT TTCCGTGCTG 1380  
 ATCCGTGAAG ATGATCTGGA TGCTGCTGCA CGTGCAATGC ATGAGCAGTT CCAGCTGGGC 1440  
 GCGGAAGACG AAGCCGTCGT TTATGCAGGC ACCGGACGCT AAAGTTTAA AGGAGTAGTT 1500  
 TTACAATGAC CACCATGCGA GTTGTGGTG CAACCGGCCA GGTCCGCCAG GTTATGCGCA 1560  
 CCCTTTTGA AGAGCGCAAT TTCCAGCTG AACTGTTTCG TTTCTTTGCT TCCCGCGTT 1620  
 CCGCAGGCCG TAAGATTGAA TTC 1643

【0122】配列番号：22

配列の長さ：23 bases

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

アンチセンス：NO

配列

GGATCCCCAA TCGATACCTG GAA 23

【0123】配列番号：23

配列の長さ：23 bases

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

アンチセンス：YES

配列

CGGTTTCATCG CCAAGTTTTT CTT 23

【0124】配列番号：24

配列の長さ：2001 base pairs

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

起源：

生物名：ブレビバクテリウム・ラクtofermentum (Brevibacterium lactofermentum)

株名：ATCC 13869

配列の特徴：

特徴を表す記号：CDS

存在位置：730..1473

配列

GGATCCCCAA TCGATACCTG GAACGACAAC CTGATCAGGA TATCCAATGC CTTGAATATT 60  
 GACGTTGAGG AAGGAATCAC CAGCCATCTC AACTGGAAGA CCGACGCT GCTGAATTGG 120  
 ATCAGTGGCC CAATCGACCC ACCAACCAGG TTGGCTATTA CCGCGGATAT CAAAAACAAC 180

TCGCGTGAAC GTTTCGTGCT CGGCAACGCG GATGCCAGCG ATCGACATAT CGGAGTCACC	240
AACCTTGAGCC TGCTGCTTCT GATCCATCGA CGGGGAACCC AACGGCGGCA AAGCAGTGGG	300
GGAAGGGGAG TTGGTGGACT CTGAATCAGT GGGCTCTGAA GTGGTAGGCG ACGGGGCAGC	360
ATCTGAAGGC GTGCGAGTTG TGGTGACCGG GTTAGCGGTT TCAGTTTCTG TCACAACTGG	420
AGCAGGACTA GCAGAGGTTG TAGGCGTTGA GCCGCTTCCA TCACAAGCAC TTAAAAGTAA	480
AGAGGCGGAA ACCACAAGCG CCAAGGAACT ACCTGCGGAA CGGGCGGTGA AGGGCAACTT	540
AAGTCTCATA TTTCAAACAT AGTTCCACCT GTGTGATTAA TCTCCAGAAC GGAACAAACT	600
GATGAACAAT CGTTAACAAC ACAGACCAAA ACGGTCAGTT AGGTATGGAT ATCAGCACCT	660
TCTGAATGGG TACGTCTAGA CTGGTGGCGG TTTGAAAAAC TCTTCGCCCC ACGAAAATGA	720
AGGAGCATA ATG GGA ATC AAG GTT GGC GTT CTC GGA GCC AAA GGC CGT	768
Met Gly Ile Lys Val Gly Val Leu Gly Ala Lys Gly Arg	
1 5 10	
GTT GGT CAA ACT ATT GTG GCA GCA GTC AAT GAG TCC GAC GAT CTG GAG	816
Val Gly Gln Thr Ile Val Ala Ala Val Asn Glu Ser Asp Asp Leu Glu	
15 20 25	
CTT GTT GCA GAG ATC GGC GTC GAC GAT GAT TTG AGC CTT CTG GTA GAC	864
Leu Val Ala Glu Ile Gly Val Asp Asp Asp Leu Ser Leu Leu Val Asp	
30 35 40 45	
AAC GGC GCT GAA GTT GTC GTT GAC TTC ACC ACT CCT AAC GCT GTG ATG	912
Asn Gly Ala Glu Val Val Val Asp Phe Thr Thr Pro Asn Ala Val Met	
50 55 60	
GGC AAC CTG GAG TTC TGC ATC AAC AAC GGC ATT TCT GCG GTT GTT GGA	960
Gly Asn Leu Glu Phe Cys Ile Asn Asn Gly Ile Ser Ala Val Val Gly	
65 70 75	
ACC ACG GGC TTC GAT GAT GCT CGT TTG GAG CAG GTT CGC GCC TGG CTT	1008
Thr Thr Gly Phe Asp Asp Ala Arg Leu Glu Gln Val Arg Ala Trp Leu	
80 85 90	
GAA GGA AAA GAC AAT GTC GGT GTT CTG ATC GCA CCT AAC TTT GCT ATC	1056
Glu Gly Lys Asp Asn Val Gly Val Leu Ile Ala Pro Asn Phe Ala Ile	
95 100 105	
TCT GCG GTG TTG ACC ATG GTC TTT TCC AAG CAG GCT GCC CGC TTC TTC	1104
Ser Ala Val Leu Thr Met Val Phe Ser Lys Gln Ala Ala Arg Phe Phe	
110 115 120 125	
GAA TCA GCT GAA GTT ATT GAG CTG CAC CAC CCC AAC AAG CTG GAT GCA	1152
Glu Ser Ala Glu Val Ile Glu Leu His His Pro Asn Lys Leu Asp Ala	
130 135 140	
CCT TCA GGC ACC GCG ATC CAC ACT GCT CAG GGC ATT GCT GCG GCA CGC	1200
Pro Ser Gly Thr Ala Ile His Thr Ala Gln Gly Ile Ala Ala Ala Arg	
145 150 155	
AAA GAA GCA GGC ATG GAC GCA CAG CCA GAT GCG ACC GAG CAG GCA CTT	1248
Lys Glu Ala Gly Met Asp Ala Gln Pro Asp Ala Thr Glu Gln Ala Leu	
160 165 170	
GAG GGT TCC CGT GGC GCA AGC GTA GAT GGA ATC CCA GTT CAC GCA GTC	1296
Glu Gly Ser Arg Gly Ala Ser Val Asp Gly Ile Pro Val His Ala Val	
175 180 185	
CGC ATG TCC GGC ATG GTT GCT CAC GAG CAA GTT ATC TTT GGC ACC CAG	1344
Arg Met Ser Gly Met Val Ala His Glu Gln Val Ile Phe Gly Thr Gln	
190 195 200 205	
GGT CAG ACC TTG ACC ATC AAG CAG GAC TCC TAT GAT CGC AAC TCA TTT	1392
Gly Gln Thr Leu Thr Ile Lys Gln Asp Ser Tyr Asp Arg Asn Ser Phe	



210	215	220	
GCA CCA GGT GTC TTG GTG GGT GTG CGC AAC ATT GCA CAG CAC CCA GGC			1440
Ala Pro Gly Val Leu Val Gly Val Arg Asn Ile Ala Gln His Pro Gly			
225	230	235	
CTA GTC GTA GGA CTT GAG CAT TAC CTA GGC CTG TAAAGGCTCA TTTCAGCAGC			1493
Leu Val Val Gly Leu Glu His Tyr Leu Gly Leu			
240	245		
GGGTGGAATT TTTTAAAAGG AGCGTTTAAA GGCTGTGGCC GAACAAGTTA AATTGAGCGT			1553
GGAGTTGATA GCGTGCAGTT CTTTACTCC ACCCGCTGAT GTTGAGTGGT CAACTGATGT			1613
TGAGGGCGCG GAAGCACTCG TCGAGTTTGC GGGTCGTGCC TGCTACGAAA CTTTGTATAA			1673
GCCGAACCCCT CGAACTGCTT CCAATGCTGC GTATCTCGCG CACATCATGG AAGTGGGGCA			1733
CACTGCTTTG CTTGAGCATG CCAATGCCAC GATGTATATC CGAGGCATTT CTCGGTCCGC			1793
GACCCATGAA TTGGTCGAC ACCGCCATTT TTCCTTCTCT CAACTGTCTC AGCGTTTCGT			1853
GCACAGCGGA GAATCGGAAG TAGTGGTGCC CACTCTCATC GATGAAGATC CGCAGTTGCG			1913
TGAACCTTTC ATGCACGCCA TGGATGAGTC TCGGTTGCTT TTCAATGAGC TGCTTAATGC			1973
GCTGGAAGAA AAACCTGGCG ATGAACCG			2001

【0125】配列番号：25

配列の長さ：45 bases

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

アンチセンス：NO

配列

CCGGACAGCT CACCCACAAA ATCAATGCAC TCTAAAAGG TACCT 45

【0126】配列番号：26

配列の長さ：45 bases

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

アンチセンス：YES

配列

CTAGAGGTAC CTTTTAGAG TGCATTGATT TTGTGGGTGA GCTGT 45

【0127】配列番号：27

配列の長さ：34 bases

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

アンチセンス：NO

配列

CTAGCTCGAG ATATCAGATC TACTAGTCGA CCGC 34

【0128】配列番号：28

配列の長さ：28 bases

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

アンチセンス：YES

配列

GGTCGACTAG TAGATCTGAT ATCTCGAG 28

【図面の簡単な説明】

【図1】 各種人工トランスポゾン（Kmrはネオマイシンフォスフトランスフェラーゼ遺伝子（カナマイシン耐性遺伝子）、Tnpはトランスポゼース遺伝子、黒く塗りつぶした部分はインバーテッドリピート配列を示す。）

【図2】 人工トランスポゾンを搭載したプラスミドpHTN7141とpHTN7142の構築図である。

【図3】 人工トランスポゾンを搭載したプラスミドpHTN7143の構築図である。

【図4】 人工トランスポゾンを搭載したプラスミドpHTN7144の構築図である。

【図5】 プラスミドpHIS714K1とpHIS714K2の構築図である。

【図6】 人工トランスポゾンを搭載したプラスミドpHTN7145の構築図である。

【図7】 人工トランスポゾンを搭載したプラスミドpHTN7151の構築図である。

【図8】 人工トランスポゾンを搭載したプラスミドpHTN7152の構築図である。

【図9】 人工トランスポゾンを搭載したプラスミドpHTN7156-Cの構築図である。

【図10】 プラスミドpORF1の構築図である。

【図11】 プラスミドpORF3とpORF4の構築図である。

【図12】 プラスミドpORF7の構築図である。

【図13】 プラスミドpORF8の構築図である。

【図14】 トランスポゾンユニットを搭載したプラスミドpORF41の構築図である。

【図15】 プラスミドpORFC0の構築図である。

【図16】 インサージョンシーケンス、人工トランスポゾン及びトランスポゾンユニットの構造の相違を示す略図である。Tcrはテトラサイクリン耐性遺伝子、Tnpはトランスポゼース遺伝子、黒く塗りつぶした部分はインバーテッドリピート配列（IR）を示す。また、各構造の略図の下に点線で示した部分は転移領域を示す。

【図17】 プラスミドpORF40の構築図である。

【図18】 プラスミドpVK7の構築図である。

【図19】 プラスミドpVC7の構築図である。

【図20】 プラスミドp399LYSA及びプラスミドp299LYSAの構築図である。

【図21】 プラスミドpABLmの構築図である。

【図22】 プラスミドpCRDAPAの構築図である。

【図23】 プラスミドp399DPSの構築図である。

【図24】 プラスミドp399AK9の構築図である。

【図25】 プラスミドpCRDAPBの構築図である。

【図26】 プラスミドp399CAB及びプラスミドpCABの構築図である。

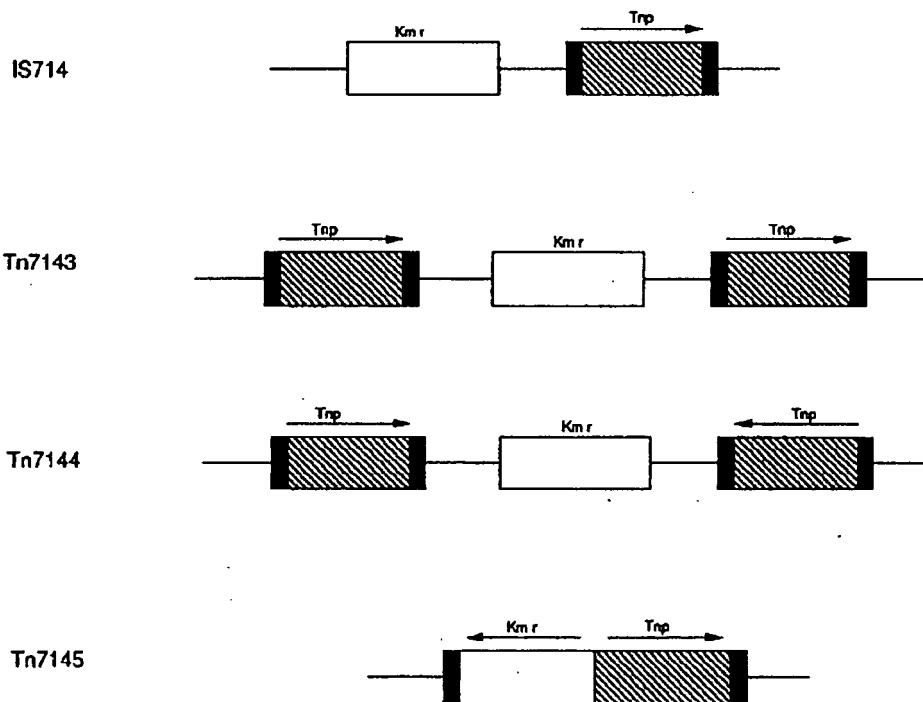
【図27】 プラスミドpCABLの構築図である。

【図28】 プラスミドpHTN7150Aの構築図である。

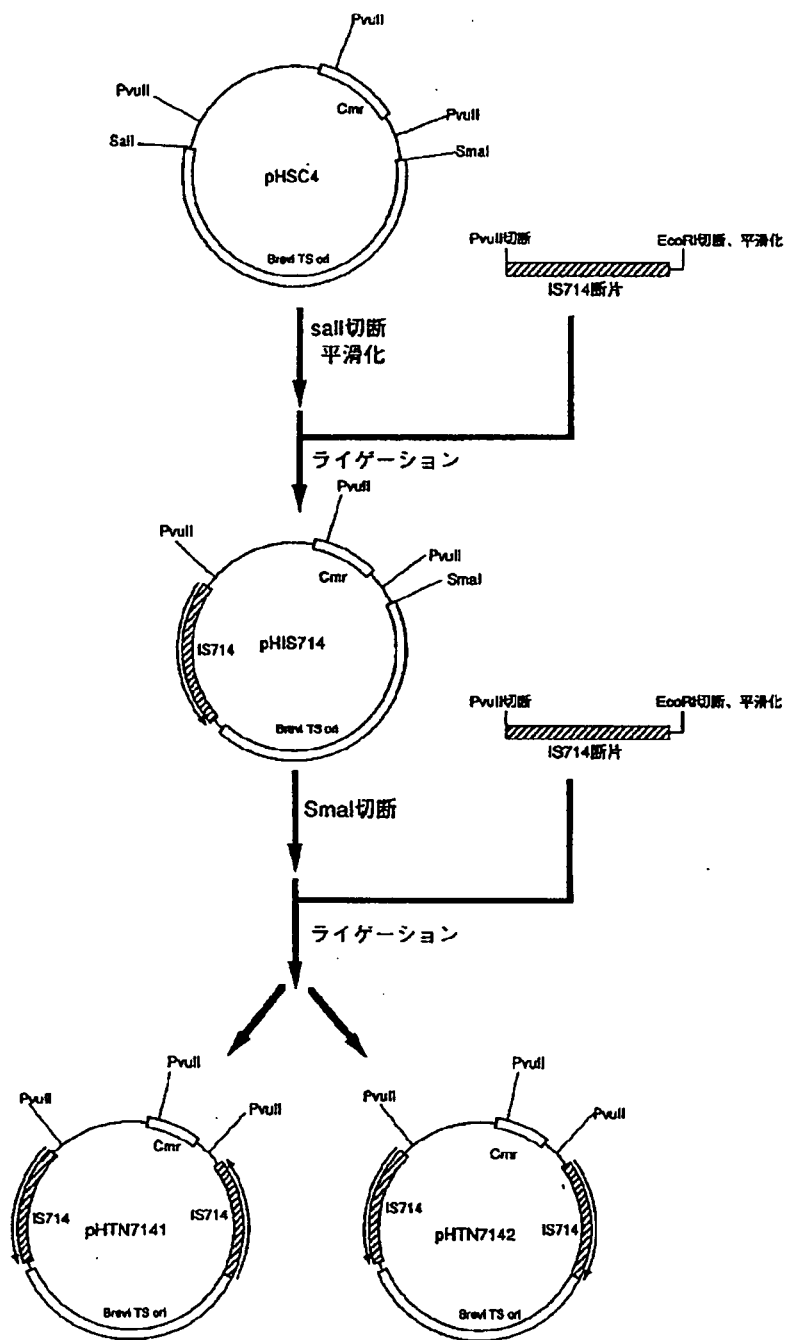
【図29】 プラスミドpCBLmcの構築図である。

【図30】 プラスミドpHTN7150の構築図である。

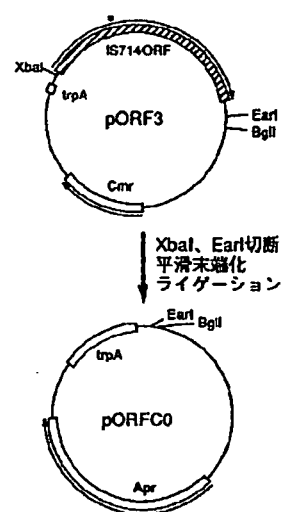
【図1】



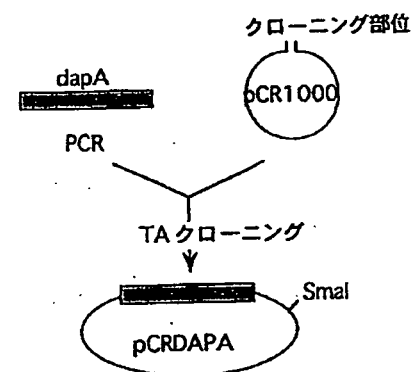
【図 2】



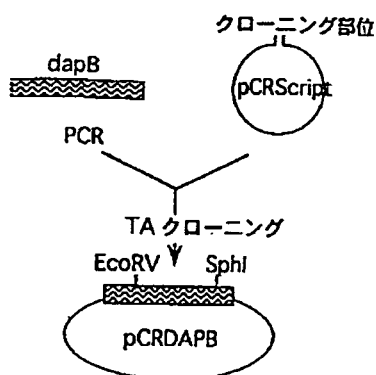
【図 15】



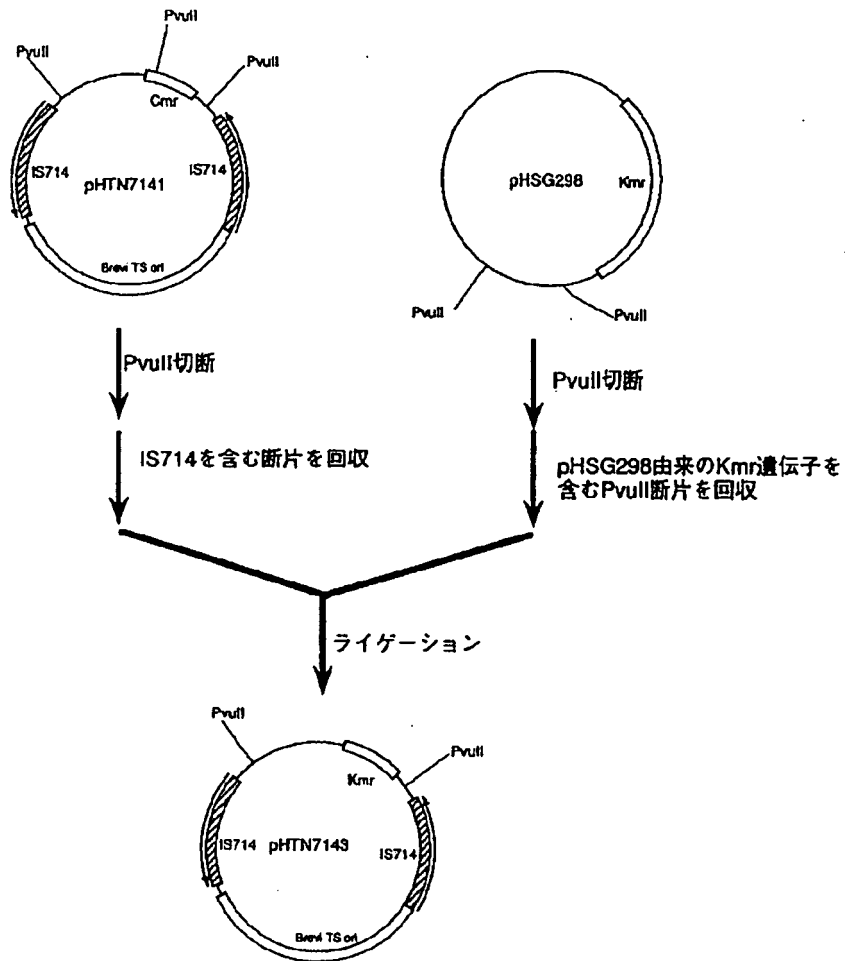
【図 22】



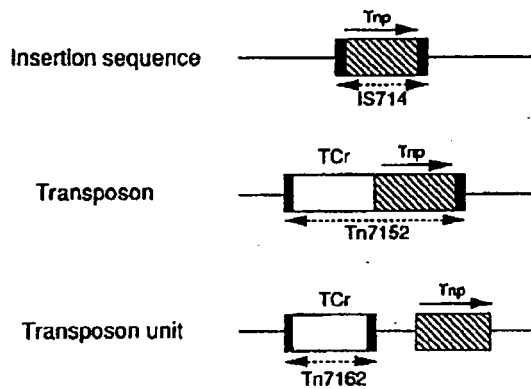
【図 25】



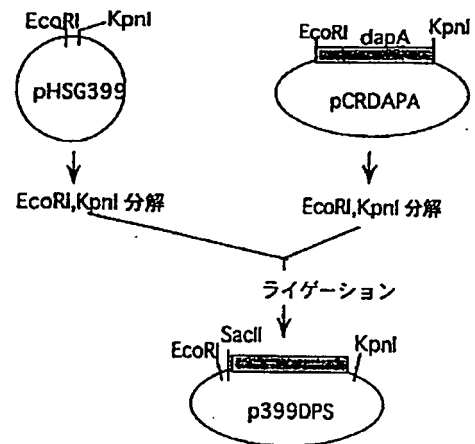
【図 3】



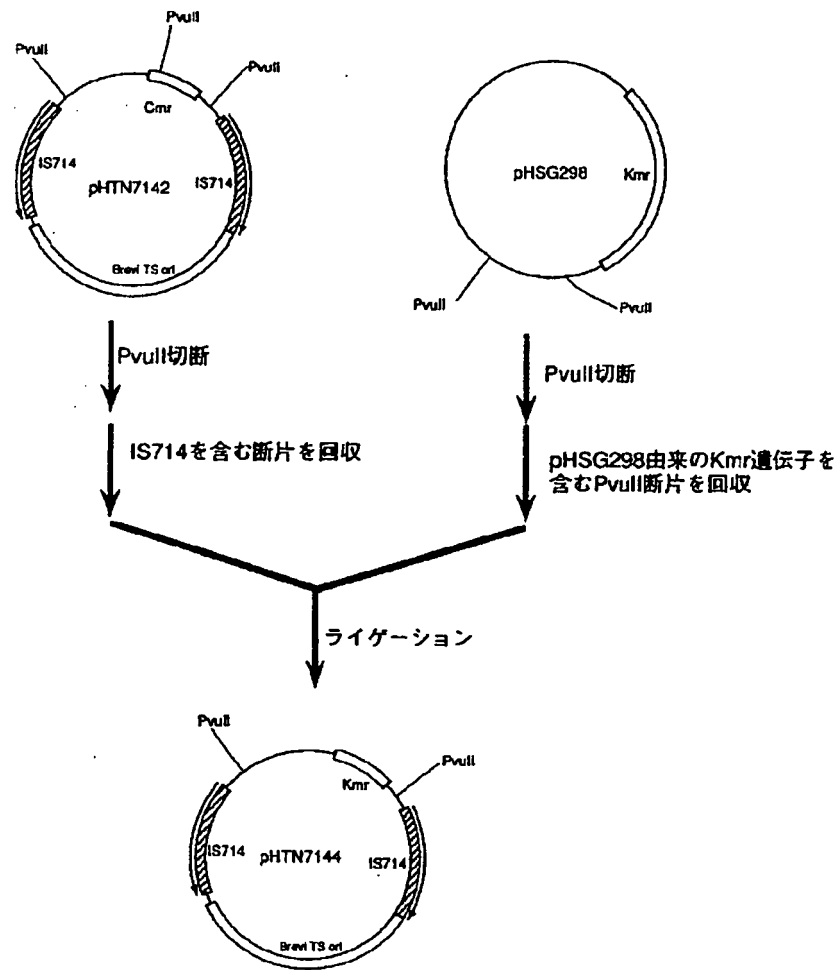
【図 1 6】



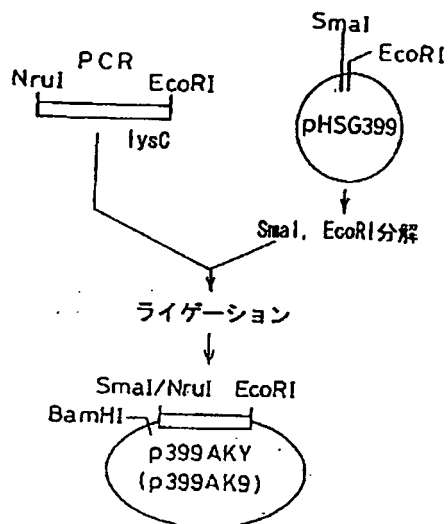
【図 2 3】



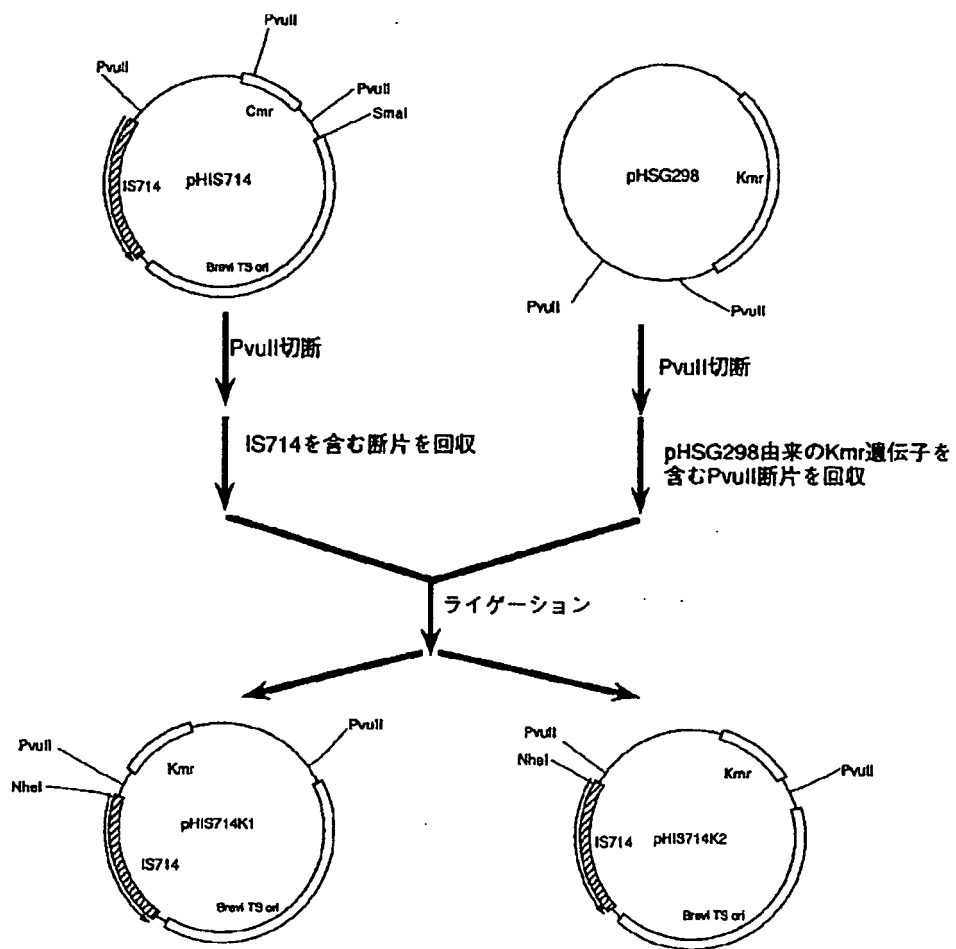
【図4】



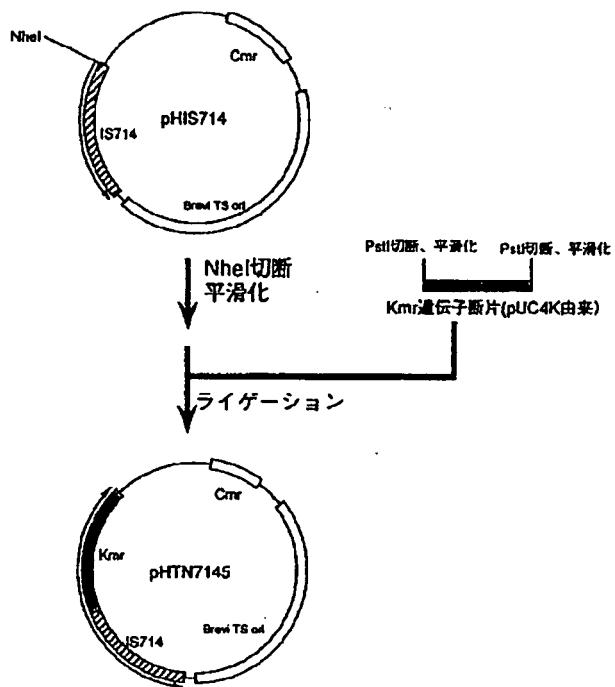
【図24】



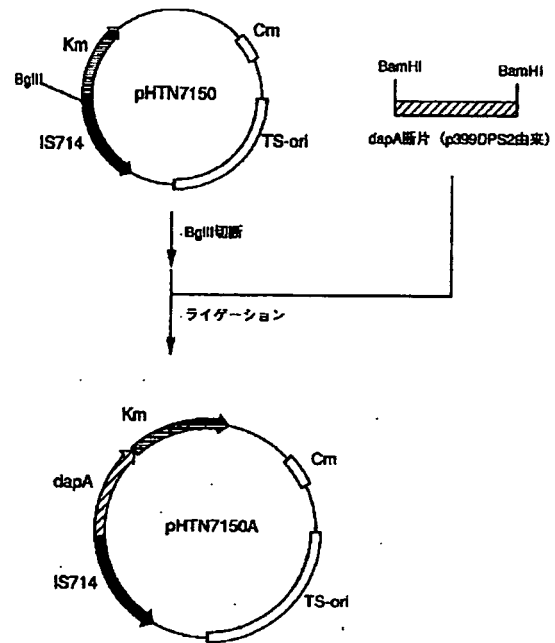
【図5】



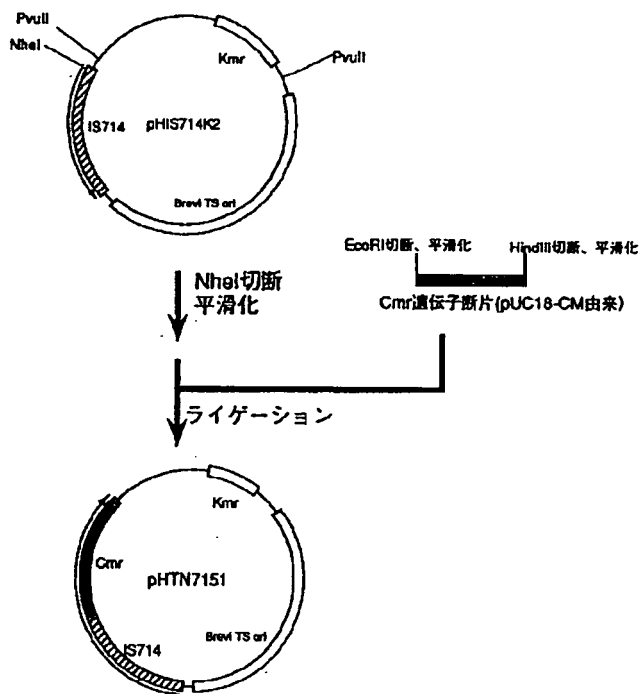
【図6】



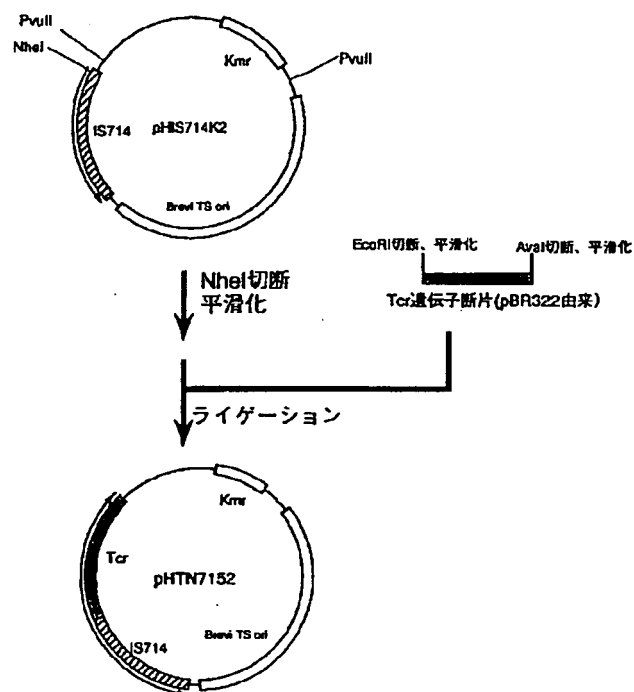
【図28】



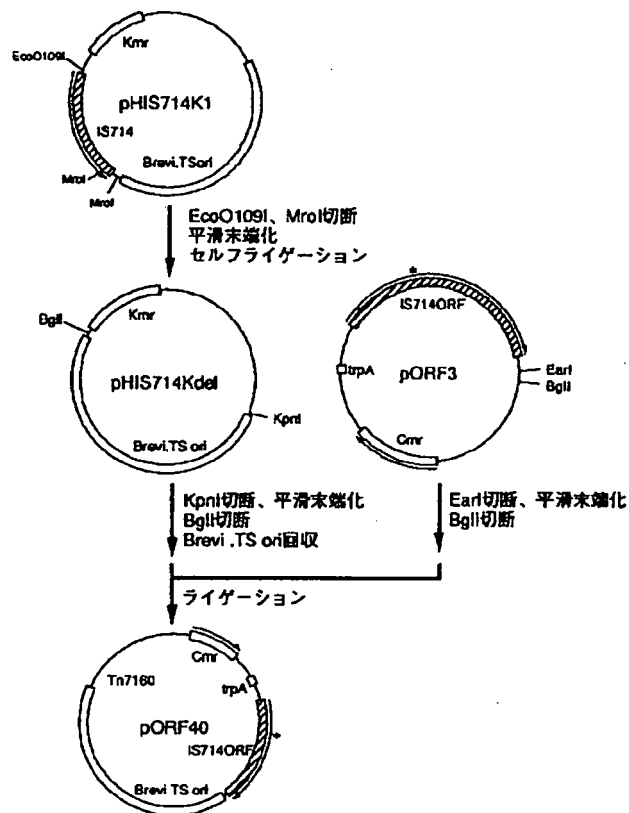
【図7】



【図8】

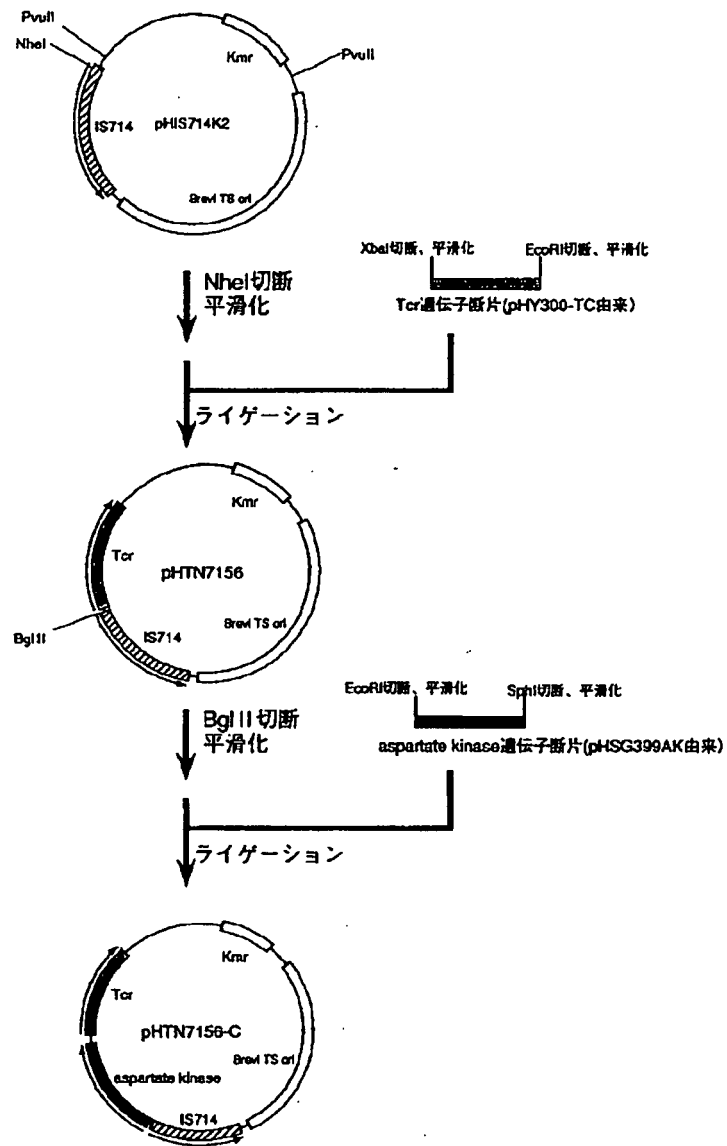


【図17】

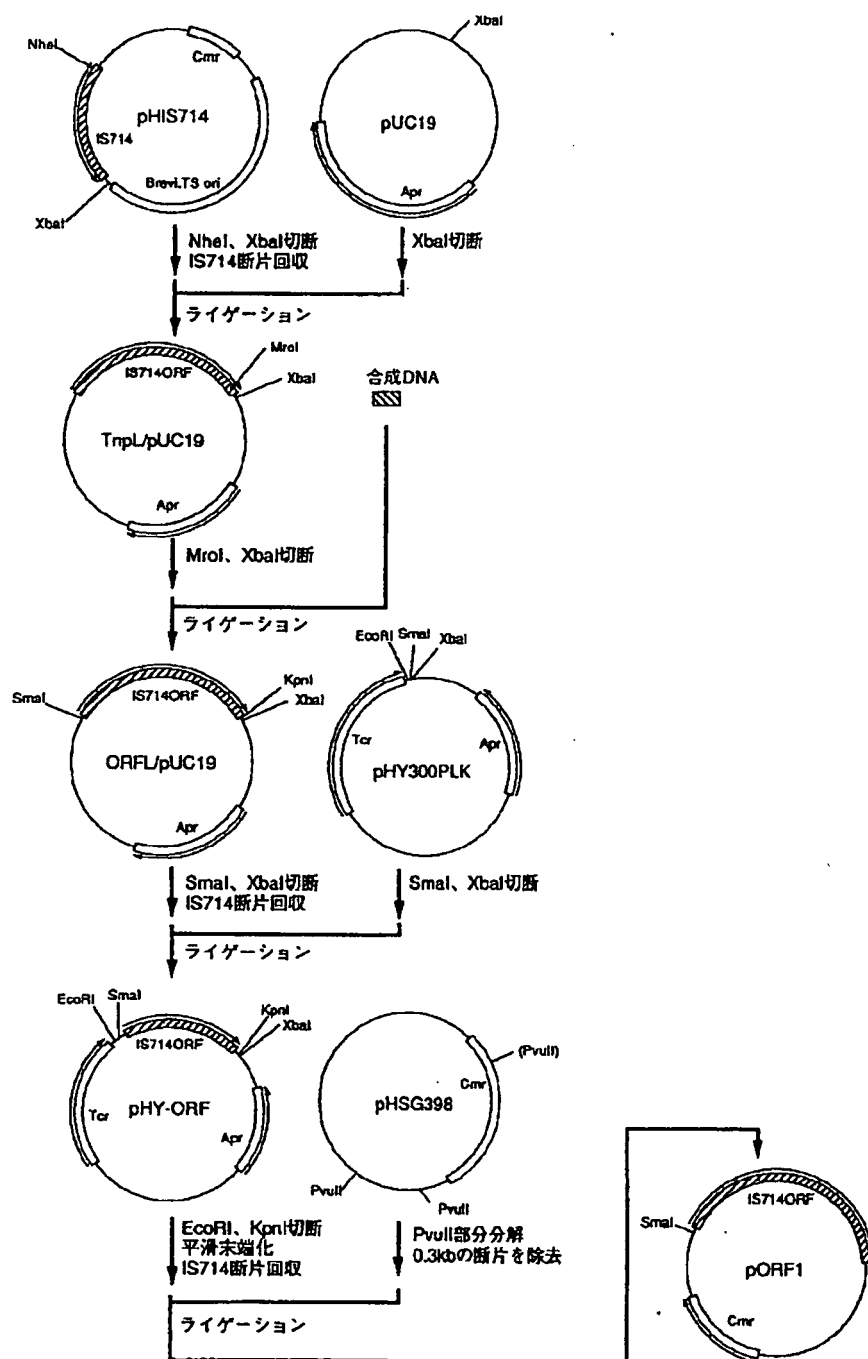




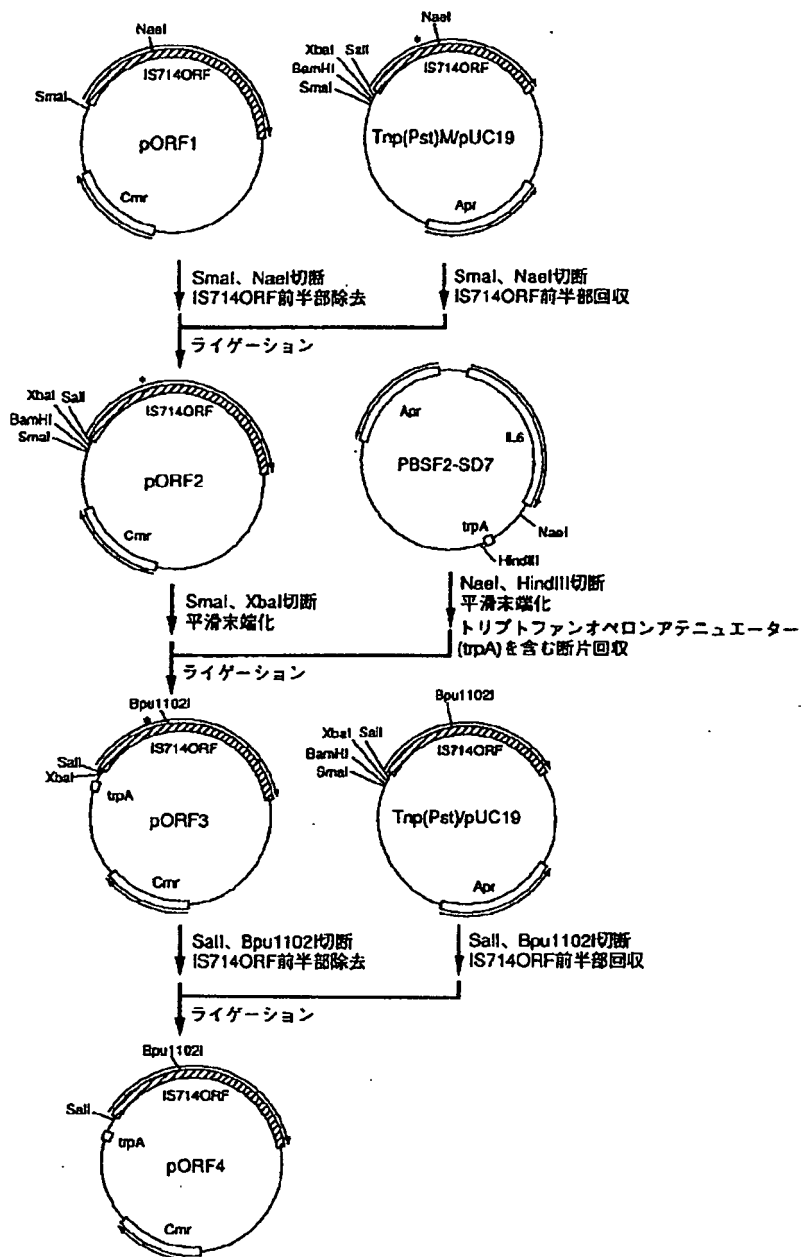
【図9】



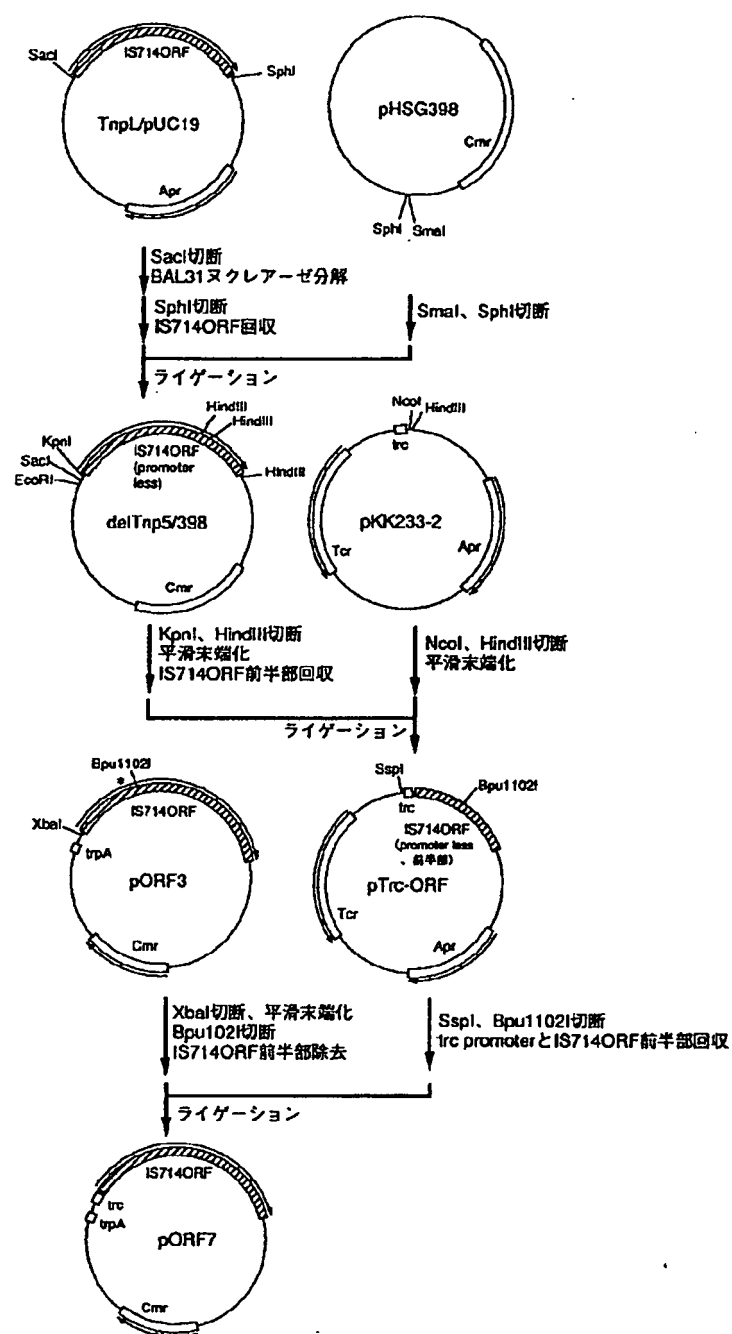
【図10】



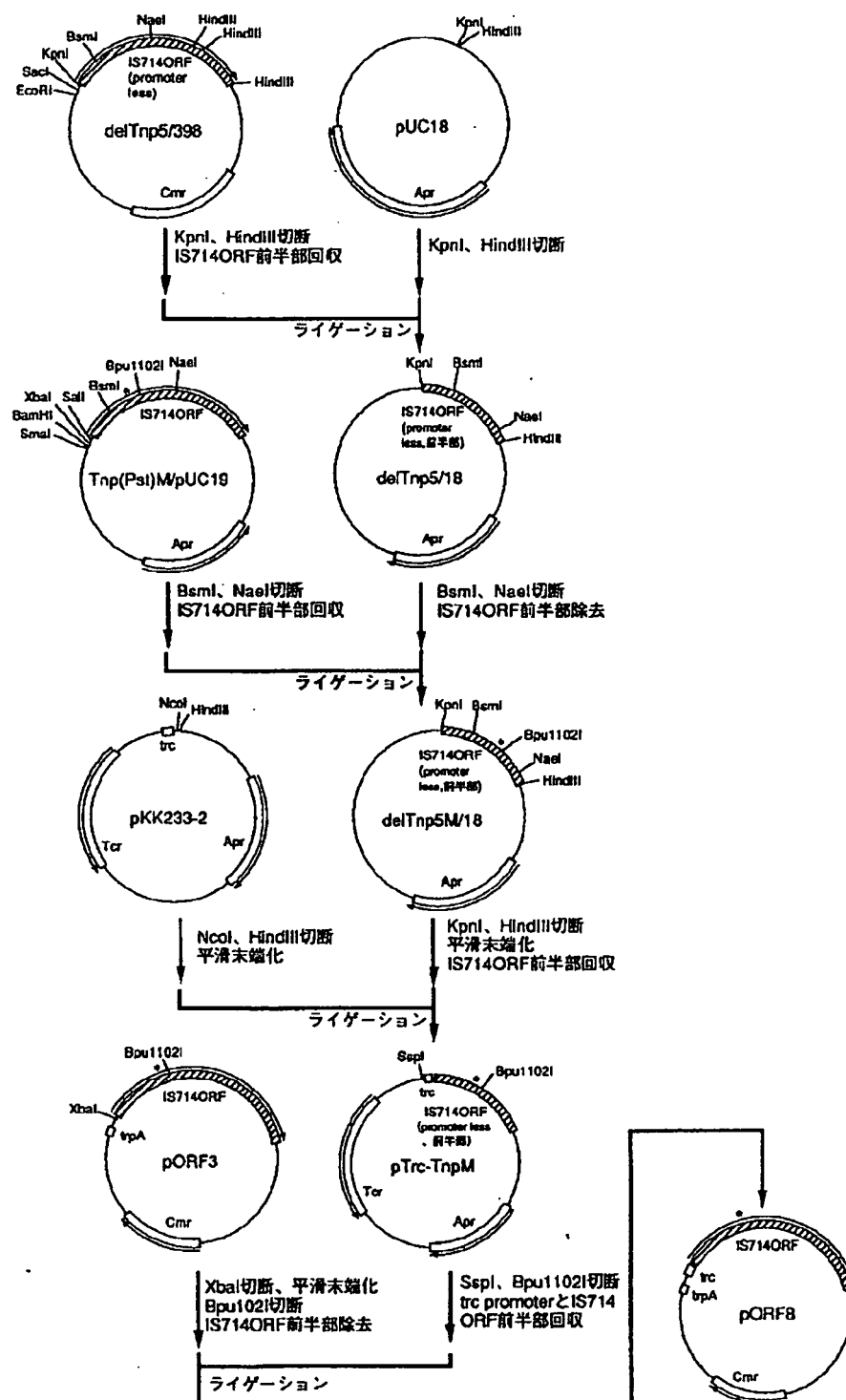
【図11】



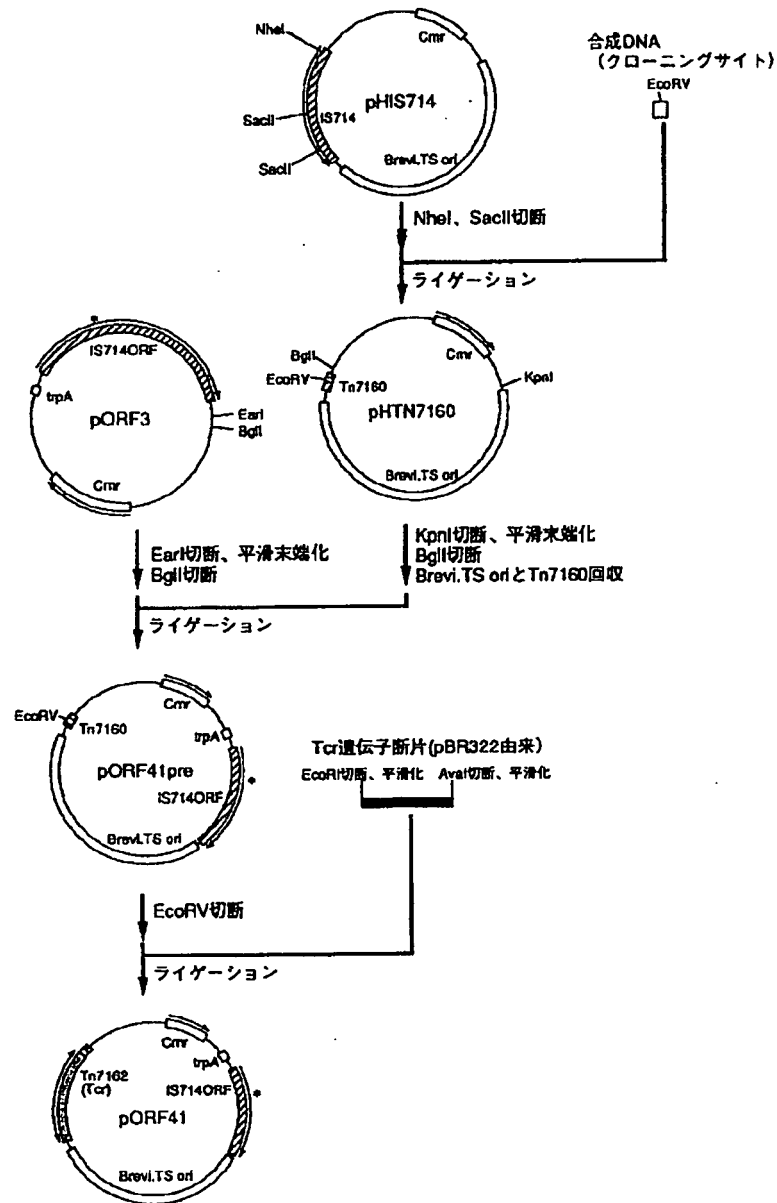
【図12】



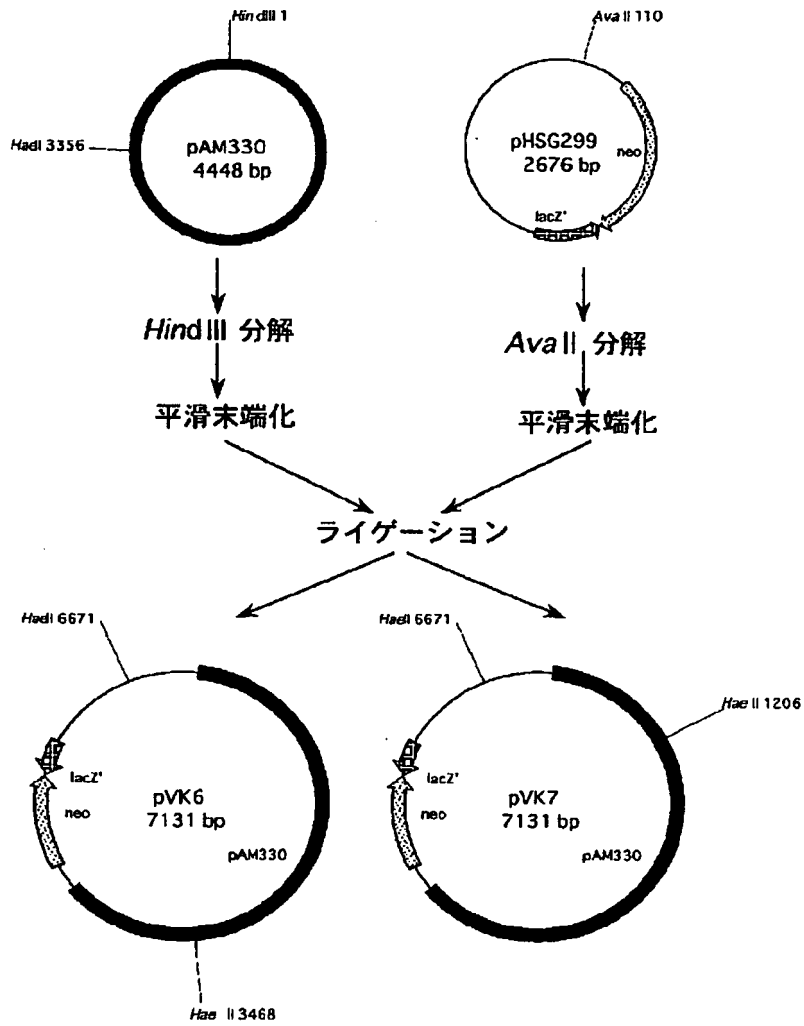
【図13】



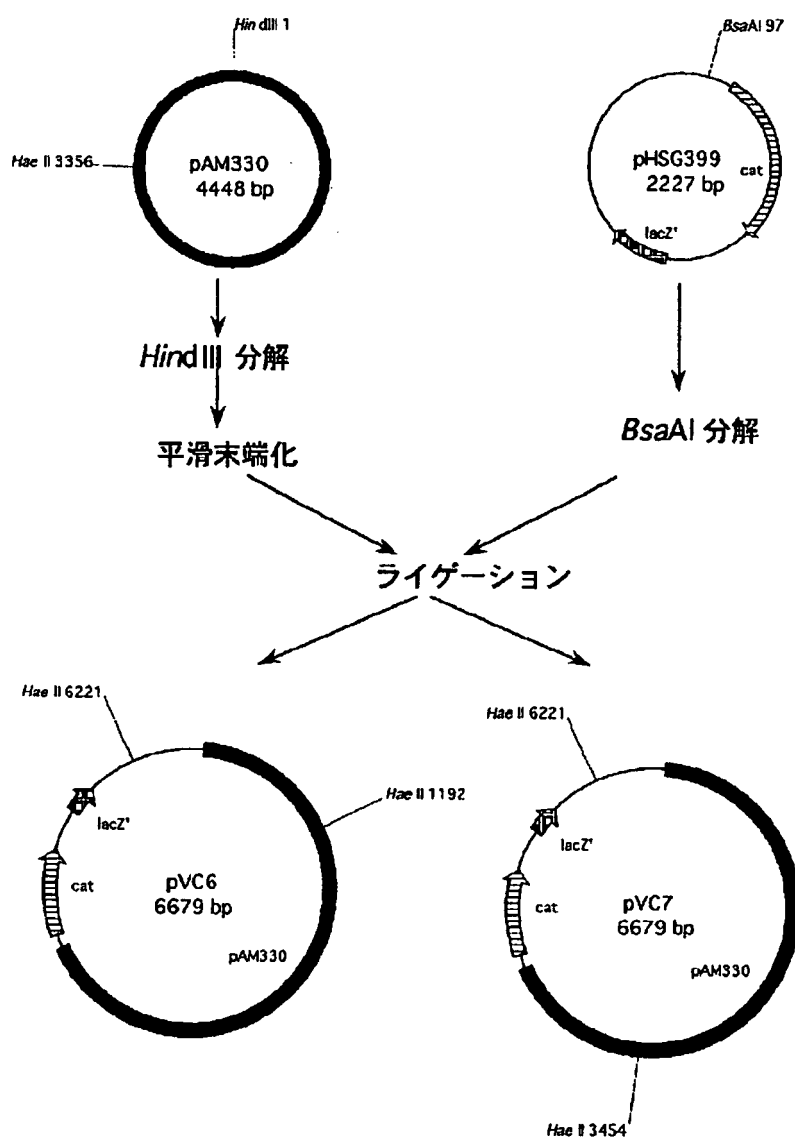
【図14】



【図18】

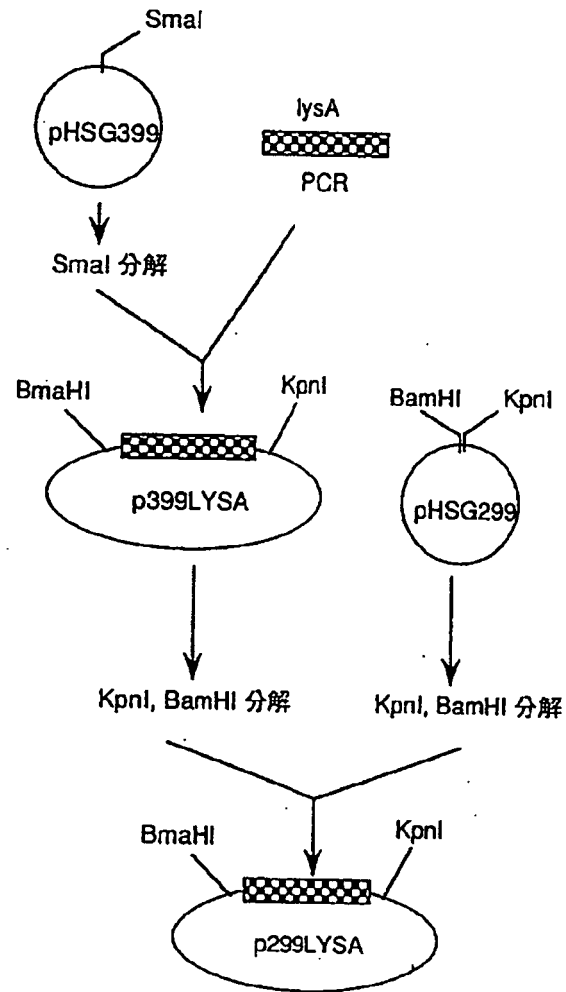


【図19】

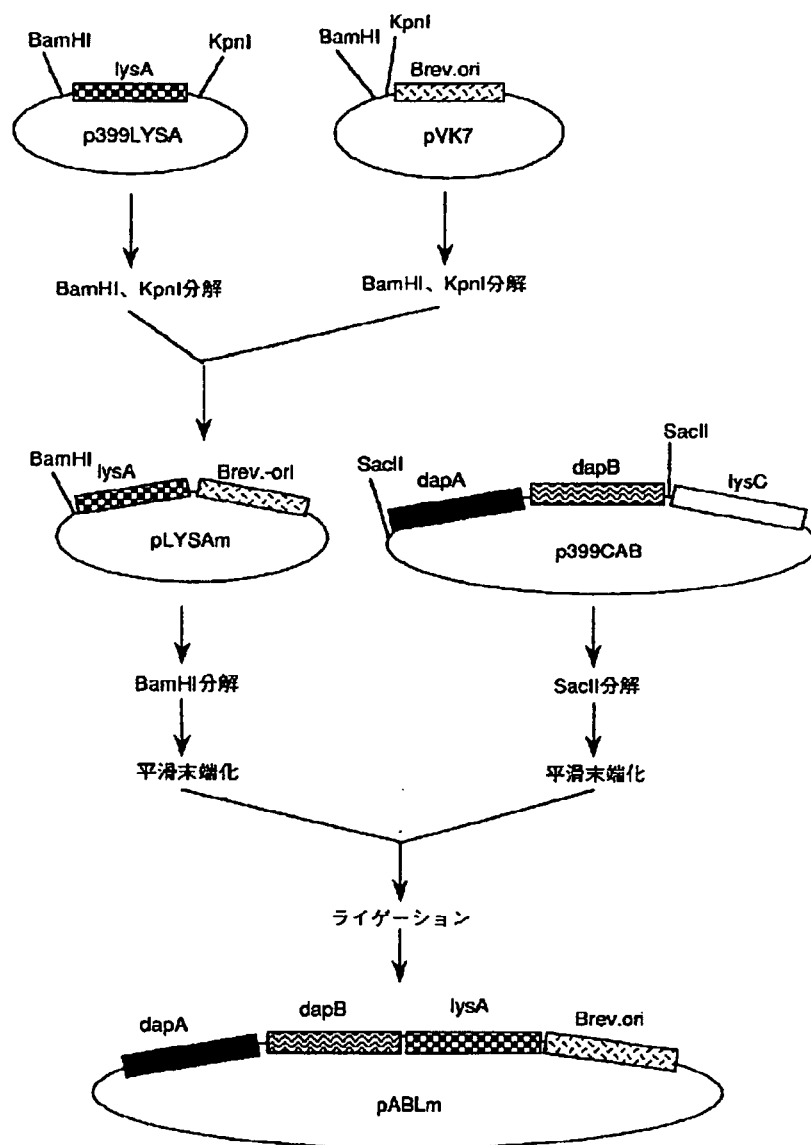




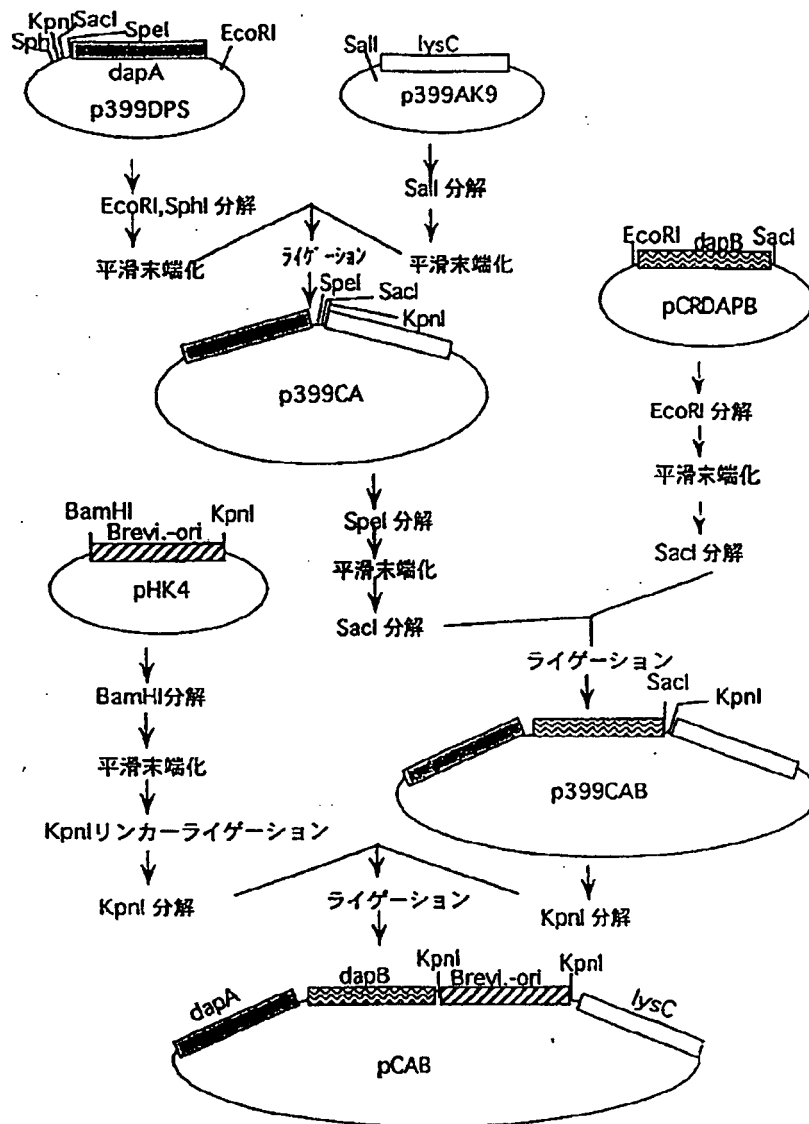
【図20】



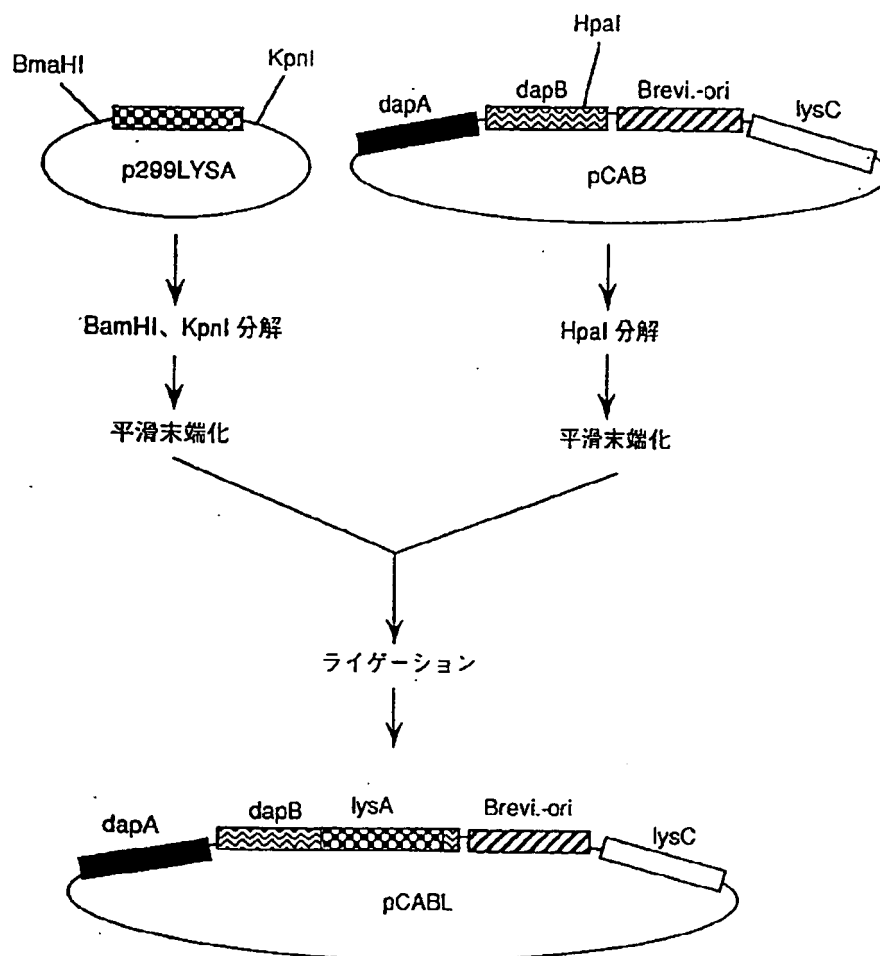
【図21】



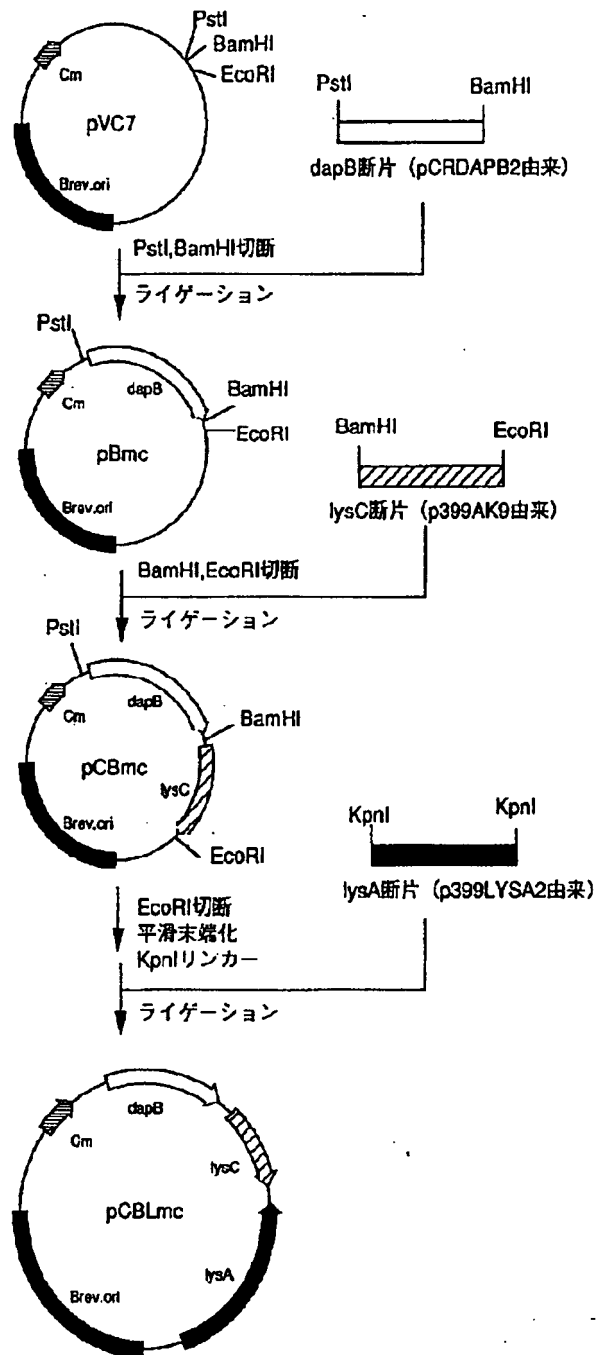
【図26】



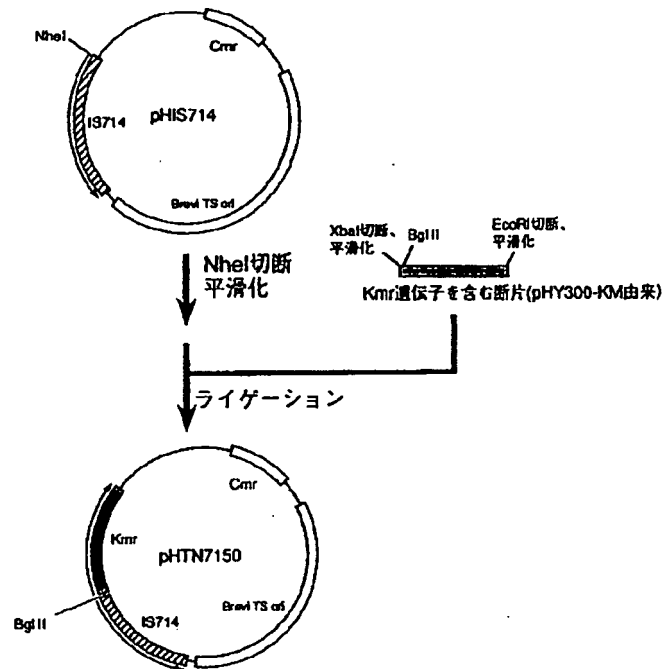
【図 2 7】



【図29】



【図30】



フロントページの続き

(51)Int. Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 Q 1/68		9453-4B	C 1 2 Q 1/68	A
(C 1 2 N 15/09	Z N A			
C 1 2 R 1:13)				
(C 1 2 N 1/21				
C 1 2 R 1:13)				
(C 1 2 N 1/21				
C 1 2 R 1:19)				
(C 1 2 P 13/08				
C 1 2 R 1:13)				
(C 1 2 N 9/12				
C 1 2 R 1:13)				
(C 1 2 N 9/12				
C 1 2 R 1:19)				

(72)発明者 平野 聖子  
 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の  
 素株式会社生産技術研究所内  
 (72)発明者 早川 敦  
 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の  
 素株式会社生産技術研究所内

(72)発明者 泉井 正子  
 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の  
 素株式会社生産技術研究所内  
 (72)発明者 杉本 雅一  
 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の  
 素株式会社生産技術研究所内